

**SOLUNULKOISTA LIGNIINIÄ TUOTTAVAAN KUUSISOLUVILJELMÄÄN
(*PICEA ABIES*) ERITTYVÄT KITINOLYYTTISET ENTSYYMIT
JA NIIDEN MAHDOLLISET KASVIPERÄISET SUBSTRAATIT**

Kaija Porkka

Maisterintutkielma

Helsingin yliopisto

Biotieteiden laitos

Kasvibiologia, kasvifysiologia

15.11.2016

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Biotieteiden laitos	
Tekijä – Författare – Author Kaija Porkka			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Solunulkoista ligniiniä tuottavaan kuusisolususpensioviljelmään (<i>Picea abies</i>) erittyvät kitinolyttiset entsyymit ja niiden mahdolliset kasviperäiset substraattit			
Oppiaine – Läroämne – Subject Kasvibiologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Maisterintutkielma	Aika – Datum – Month and year 15.11.2016	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 101	
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Kitinaasientsyymit ovat patogeneesiin liittyviä proteiineja, jotka kasvit tuottavat patogeenihiökkäyksen vaikutuksesta. Niiden on myös todettu toimivan kasvien abioottisten stressien yhteydessä sekä signaalointiin liittyen. Kitinaasit katalysoivat kitinin β-1,4-<i>N</i>-asetyyli-glukosamiinisyksoidien pilkkoutumista. Kitiiniä ei tavata kasveissa, mutta sitä esiintyy runsaasti esimerkiksi selkärangattomien eliöiden kuorissa, joidenkin sienien ja levien soluseinissä sekä bakteereissa. Kitinaasit ovat olleet viime aikoina huomion kohteena, koska niillä on katsottu olevan hyödyntämismahdollisuuksia lääkkeiden kehityksessä, maataloudessa, elintarviketeollisuudessa ja biopolttoaineiden valmistuksessa.</p> <p>Solunulkoista ligniiniä tuottavassa kuusisolususpensioviljelmässä (<i>Picea abies</i> L. Karst.) on todettu voimakasta kitinaasigeenien ilmenemistä ja myös kitinaasiaktiivisuutta. Kasvikitinaaseja tiedetään syntyneen kehityksellisissä prosesseissa, ja kitinaasien kaltaisten geenien on todettu olleen oleellisia selluloosasynteesissä ja soluseinien ja johtosolukoiden kehityksessä ja vaikuttaneen ligniinin esiintymiseen solukoissa. Siksi kitinaasien erittyminen viljelyalustaan ei välttämättä ole stressin aiheuttamaa ja kitinaasit saattavat hyödyntää kitinin ohella myös jotakin kasviperäistä substraattia.</p> <p>Koska kitiiniä esiintyy kasvipatogeenien rakenteissa mutta ei kasveissa ja tutkimusmateriaalina olleen aseptisen kuusisoluviljelmän kasvatusolot olivat vakaat, tutkimushypoteesina oli, että viljelyalustaan erittyneet kitinaasit eivät olleet stressireaktio, vaan ne liittyvät kehitykseen ja toimivat patogeenikitiinin lisäksi myös jollakin kuusiperäisellä polysakkaridisubstraattilla. Lisähypoteesina oli viljelmän runsaan kitinaasi- ja kitinaasin kaltaisten geenien ilmenemisen yhteys kyseisen kuusisolulinjan solunulkoiseen ligniinin tuotantoon. Tutkimuksen tarkoituksena oli kartoittaa kuusisoluviljelmän alustan ja kehittyvän puun kitinaasien ja kitinaasien kaltaisten entsyymien ominaisuuksia eristämällä, puhdistamalla ja kloonamalla niitä ja tuottamalla niitä heterologisesti. Tavoitteena oli myös tunnistaa kitinaasien ja kitinaasin kaltaisten proteiinien substraatteja, jotta kitinaasien merkitys kuusisolukon kehityksessä ymmärrettäisiin paremmin.</p> <p>Työssä eristettiin ja puhdistettiin kromatografisesti kaksi kuusisoluviljelmäalustan kitinaasia. Lisäksi kloonattiin kuusisoluviljelmän kitinaasigeeni ja kuusipuussa esiintyvän kitinaasin kaltainen geeni, minkä jälkeen kitinaaseja ja kitinaasien kaltaisia proteiineja tuotettiin <i>Pichia pastoris</i> -hiivassa. Kuusen soluviljelyalustan kokonaisproteiiniseoksen, alustasta eristettyjen ja puhdistettujen kitinaasien sekä <i>P. pastoris</i> -hiivassa tuotettujen kuusen kitinaasien ja kitinaasien kaltaisten entsyymien substraattivaihtoehtoja analysoitiin hiilihydraattimikrokalvomenetelmällä. Yhteyttä solunulkoisen ligniinin ja viljelyalustan kitinolyttisten entsyymien välillä ei löydetty eikä ilmeisiä substraattiehdokkaita todettu. Mannaanien pilkkoutuminen kitinaasientsyymien läsnä ollessa oli kuitenkin riittävän voimakasta antaakseen aihetta jatkotutkimukselle.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Kitinaasi, kitinaasin kaltainen geeni, CTL, ligniini, hiilihydraattimikrokalvo, mannaani, ksy-laani, ksyloglukaani			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Anna Kärkönen			

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of Biological and Environmental Sciences		Laitos – Institution – Department Department of Biosciences	
Tekijä – Författare – Author Kaija Porkka			
Työn nimi – Arbetets titel – Title The chitinolytic enzymes secreted in the cell suspension culture of Norway spruce (<i>Picea abies</i>) producing apoplastic lignin, and their possible endogenous substrates			
Oppiaine – Läroämne – Subject Plant biology			
Työn laji – Arbetets art – Level Master's thesis	Aika – Datum – Month and year 15.11.2016	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 101	
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Chitinolytic enzymes belong to a group of pathogenesis-related proteins, which are induced in plants by a pathogenic attack. They have also been shown to function in abiotic stresses and related to signalling. Chitinases catalyze the degradation of β-1,4-<i>N</i>-acetyl glucosamine units of chitin. Chitin is not found in plants, but for example the shells of invertebrates, cell walls of certain fungi, algae and bacteria contain it abundantly. Lately chitinases have gathered attention because of their potential utilization possibilities in medicine, agriculture, food industry and biofuels.</p> <p>Strong chitinase gene expression and also chitinolytic activity has been found in a spruce (<i>Picea abies</i> L. Karst.) cell culture, which produces apoplastic lignin into the medium. Plant chitinases are known to be induced also in developmental processes. Chitinase-like genes have been shown to be essential in cellulose synthesis and in development of cell walls and tracheary elements and also affected the localisation of lignin in tissues. Therefore, the secretion of chitinases into the culture medium has not necessarily been caused by stress and chitinases might use also some endogenic substrate in addition to chitin.</p> <p>Because chitin is a structural component of plant pathogens but not present in plants and the growing circumstances of the studied aseptically spruce cell culture were stable, the research hypothesis was, that the secreted chitinases in the culture medium were not a stress reaction but related to development and besides chitin of the pathogens they utilize some own polysaccharide substrate of spruce. Additional hypothesis was connection of the strong expression of chitinases and chitinase-like genes in the culture medium and the production of apoplastic lignin by the spruce cell line. The aim of the study was to characterize the chitinases and chitinase-like enzymes of the spruce cell suspension culture medium and developing xylem by isolating, purifying and cloning them and by producing them heterologously. The aim was also to identify the putative endogenous substrates for the chitinases and chitinase-like proteins to reach better understanding about the meaning of the chitinases in the development of the spruce tissues.</p> <p>Two chitinases of the spruce cell suspension culture were isolated and purified by chromatographic methods. One chitinase gene in spruce cell culture and one chitinase-like gene in spruce xylem were cloned, after which the chitinases and chitinase-like proteins were produced in <i>Pichia pastoris</i> yeast. The total proteins of the culture medium, the purified chitinases isolated from the medium and the chitinases and chitinase-like proteins produced in <i>P. pastoris</i> were used to examine their substrate alternatives with the carbohydrate microarray method. The connection between apoplastic lignin and the chitinolytic enzymes in culture medium was not found and obvious candidates for the endogenous substrates were not detected. However, the mannan degradation in the presence of the chitinases was strong enough to give reason to further analyses.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Chitinase, chitinase-like gene, <i>CTL</i> , lignin, carbohydrate microarray, mannan, xylan, xyloglucan			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Anna Kärkönen			

Sisällys

Lyhenteet ja käsitteet	6
1 Johdanto.....	9
2 Kirjallisuuskatsaus	9
2.1 Kitinaasientsyymit ja niiden substraatit.....	9
2.2 Kitinaasien rakenne.....	11
2.3 Kitinaasit bioottisen stressin yhteydessä.....	12
2.4 Kitinaasit ja abioottinen stressi.....	13
2.5 Kitinaasit symbioosivuorovaikutuksessa.....	14
2.6 Kitinaasit signaloinnin osana.....	15
2.7 Kasvin kehitykseen liittyvät kitinaasit	15
2.8 Kitinaasien kaltaiset proteiinit	17
2.9 Kitinaasit solukkoviljelyn yhteydessä.....	18
2.10 Kitinaasien hyödyntäminen	19
2.11 Solunulkoista ligniiniä tuottava kuusisolukko A3/85	22
3 Tutkimuksen tavoitteet.....	22
4 Aineisto ja menetelmät.....	23
4.1 Kitinaasien eristys kuusisolususpensioviljelmän alustasta	23
4.1.1 Kitinaasien puhdistus	23
4.1.2 SDS-PAGE- ja entsyymiaktiivisuusanalyysi	25
4.1.3 Western blot -analyysi	26
4.2 Kitinolyyttisten entsyymien tuotto <i>Pichia pastoris</i> -hiivassa	27
4.2.1 Komplementaarisen DNA:n (cDNA) kloonauk.....	27
4.2.2 Kitinaasi-DNA:n ja plasmidin muokkaus ja siirto hiivasoluihin	28
4.2.3 Tuotto.....	31
4.2.4 SDS-PAGE-, entsyymiaktiivisuus- ja western blot-analyysit.....	32
4.2.5 Proteiinien puhdistus	33
4.2.6 Deglykosylaatio	34
4.3 Hiilihydraattimikrokalvoanalyysi (Carbohydrate microarray).....	35
4.3.1 Entsyymien lisäys ennen uuttoja (Koe 1).....	38
Substraattien käsittely	38
CDTA-uutto pektiinien erottamista varten	39
NaOH-uutto hemiselluloosa-ainesten erottamista varten	39
Pipetointi kuoppalevyille	39
4.3.2 Entsyymien lisäys uuttojen jälkeen (Koe 2)	39

4.3.3 Entsyymien sisältämät polysakkaridit ja testaus ilman uuttoa	40
4.3.4 Näytteiden siirto kalvoille ja vasta-ainekäsittelyt	40
4.3.5 Tunnistus ja analysointi	42
5 Tulokset	42
5.1 Kuusisolususpensioviljelmän alustasta eristetyt kitinaasit	42
5.2 <i>Pichia pastoris</i> -hiivassa tuotetut kitinolyyttiset entsyymit	45
5.2.1 Puhdistus	47
5.2.2 Entsyymiaktiivisuusanalyysit	50
5.2.3 Deglykosylaatio	52
5.3 Hiilihydraattimikrokalvoanalyysit	52
5.3.1 Analyysi 1, koe 1	53
5.3.2 Analyysi 1, koe 2	54
5.3.3 Analyysi 2, koe 1	56
5.3.4 Analyysi 2, koe 2	58
5.3.5 Analyysi 2, entsyymien omat polysakkaridit	59
5.3.6 Analyysi 3, koe 1	61
5.3.7 Analyysi 3, koe 2	63
5.3.8 Analyysi 3, entsyymien omat polysakkaridit	64
6 Tulosten tarkastelu	65
6.1 Kuusisolususpensioviljelmän alustasta eristetyt kitinaasit	66
6.2 <i>Pichia pastoris</i> -hiivassa tuotetut kitinolyyttiset entsyymit	66
6.3 Hiilihydraattimikrokalvoanalyysit	69
6.3.1 Kuusisolususpensioviljelmän alustaproteiinit (Analyysi 1)	69
6.3.2 Kuusisolususpensioviljelmän alustasta eristetyt kitinaasit (Analyysi 2)	71
6.3.3 <i>Pichia pastoris</i> -hiivassa tuotetut kitinolyyttiset entsyymit (Analyysi 3)	74
7 Johtopäätökset	82
Kiitokset	83
Lähteet	84

Lyhenteet

AGE	Agaroosigeelielektroforeesi
AGP	Arabinogalaktaaniproteiini
CBM	Carbohydrate binding module, hiilihydraatin sitoutumisyksikkö
CDTA	Cyclohexane-1,2-diaminetetra-acetic acid, sykloheksaani-1,2-diamiinitetraetikkahappo
CoMPP	Comprehensive microarray polymer profiling, kattava polymerien määrittäminen mikrokaloanalyysillä
CTL	Chitinase-like, kitinaasin kaltainen
GlcNAc	<i>N</i> -asetyyliglukosamiini
LCC	Lignin-carbohydrate complex, ligniinihiilihydraattiyksikkö
mAb	Monoclonal antibody, yhdelle antigeenille spesifinen vasta-aine
NOD	Nodulation, nystyrä
PR	Pathogenesis-related, patogeenisiin liittyvä
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi

Käsitteet

Abioottinen	Elotonta materiaalia tarkoittava
Anomeeri	Sokerin rengasmuodon diastereomeeri (ei-peilikuvaisomeeri, isomeeri = orgaaninen yhdiste, jossa atomien määrä on sama mutta sijainti erilainen), jolla vain yhden hiilen konfiguraatio on erilainen
Bioottinen	Elävien organismien aikaansaama
Deglykosylaatio	Glykosylaation (hiilihydraattirakenteen) poisto
Denaturointi	Orgaanisen yhdisteen luontaisten ominaisuuksien (rakenteen, liukoisuuden ym.) muuttaminen palautuvasti tai palautumattomasti
Dimeeri	Kahden molekyylin yhteenliittymä
Ektooppinen	Sijainniltaan virheellinen, normaalista poikkeava
Elektroporaatio	Geenitekniinen menetelmä, jossa solususpensioon johdettu sähköpulsssi tekee solukalvoon reiän, josta suspensioon lisätty DNA menee solun sisään

Elisitointi	Kasvin fysiologisten tai morfologisten puolustusvasteiden kuten fytoaleksiinien tuotannon herättäminen erilaisten fyysikaalisten tai kemiallisten tekijöiden avulla
Epitooppi	Antigeenin määritysryhmä; kohta, johon vasta-aine sitoutuu
Eluaatti	Kromatografiapylvästä vapautunut yhdiste eluentissa (liikuvassa faasissa)
Etioloitunut	Pimeässä tai heikossa valossa kasvanut vaalea, pienilehtinen, pitkä- ja hentovartinen (kasvi)
Fukosylaatio	Fukoosisokerin liittäminen
Heterologinen tuotto	Tuotto vieraassa lajissa
Homopolymeerinen	Samanlaisista polymeerialayksiköistä koostuva
Hydrolyysi	Aineiden kemiallinen hajottaminen veden osallistuessa reaktioon
Indusointi	Toiminnan (esim. entsyymien tuotannon) alkuunpaneminen tai edistäminen jonkin tekijän (indusorin) toimesta
Inhibiittori	Ehkäisijä, estäjä
Inkuboida	Haudottaa, viljellä (tietyssä ajassa, lämpötilassa, valotasossa, kosteudessa, CO ₂ -pitoisuudessa ym.)
<i>In situ</i> -hybridisaatio	Nukleiinihapposekvenssien tunnistus solukosta/kudoksesta
<i>In vitro</i>	Lasissa, pullossa, koeputkessa eliöstä/solusta irrotettuna
Isoelektrinen piste	pH-arvo, jossa amfolyyttien, kuten proteiinien ja aminohappojen, positiivisten ja negatiivisten varausten summa on pienimmillään tai nolla
Kallus	Kasvien aktiivisesti jakaantuva, erilaistumaton solukko, jota muodostuu esimerkiksi haavakohtiin tai solukkoviljelmissä
Katalyyysi	Yhdisteen hajoamiseen jonkin aineen (katalysaattorin) vaikutuksesta niin, ettei katalysaattori itse muutu
Kinaasi	Fosfaattiryhmän siirtäjänä toimiva entsyymi
Knock-out -mutantti	Organismi, jonka mutatoitunut geeni ei toimi, eikä geenituotetta näin synny
Koetin	Soluun tai sen osarakenteeseen kokeellisesti liitettävä värillinen, radioaktiivinen tai fluoresoiva molekyyli, joka tunnustetaan koeoloissa
Kompetentti	DNA:ta vastaanottamaan kykenevä (solu)
Konfiguraatio	Kolmiulotteinen järjestyneisyys
Konservoitunut	Rakenne tai toiminto, joka on evoluution kuluessa säilynyt samankaltaisena eri lajeissa ja eliöryhmissä
Ligaatio	DNA:n yhteenliittäminen (DNA-ligaasientsyymillä)

Megagametofyytti	Alkiorakko, naarasalkeisvarsikko, koppisiemenisen kasvin emiön sikiäimen siemenaiheen monitumainen rakenne siemenaiheen sisällä
Metaksyleemi	Johtosolukoiden erilaistuessa kärkikasvupisteessä alkuvaiheessa syntyvän primaarisen puun (protoksyleemin) myöhemmin korvaava kestävämpi puusolukko
Oligomeeri	Pienikokoinen polymeeri, alle 20 monomeeriyksikön muodostama yhdiste
Oligosakkaridi	3–10 monosakkaridiyksiköstä muodostunut hiilihydraatti
Patogeeni	Tautia aiheuttava mikrobi
Patogeneesi	Taudin synty ja kehitys
Plasmidi	Autonominen kromosomiin kuulumaton periytyvä tekijä, itsenäisesti monistuva rengasmaisen DNA-molekyyli
Protoksyleemi	Johtosolukoiden erilaistuessa kärkikasvupisteessä alkuvaiheessa syntyvä primaarinen puusolukko
Protoplasti	Soluseinätön solu, jossa solukalvo on ulkopintana
Renaturaatio	Denaturaation vastareaktio, jossa proteiinien rakenne palautuu
Reseptori	Solun selektiivisesti jonkin aineen molekyyliä sitova rakenne, sitoutumista seuraa jokin spesifinen reaktio
Resiini	Kromatografiassa pylvääseen pakattu kiinteä faasi
Substraatti	Yhdiste, johon entsyymi kiinnittyy ja jota se raktiossa muokkaa
Supernatantti	Sentrifugoitaessa sedimentoituneen aineksen päälle jäävä nestekerros
Suspensio	Liukenemattoman kiinteän aineen ja nesteen seos, josta kiinteä aine voidaan erottaa sentrifugoiden tai seisottaen
Transglykosylaatio	Sokeriryhmän siirtäminen molekyyliltä toiselle
Transkripti	RNA-sekvenssi, johon DNA:n informaatio on transkriptiossa kopioitu
Transkriptionaalinen	Transkriptioon eli DNA-informaation kopioitumiseen RNA:lle liittyvä
Vektori	Geenitekniikassa käytetty DNA:n kuljettaja, usein plasmidi tai virus

1 Johdanto

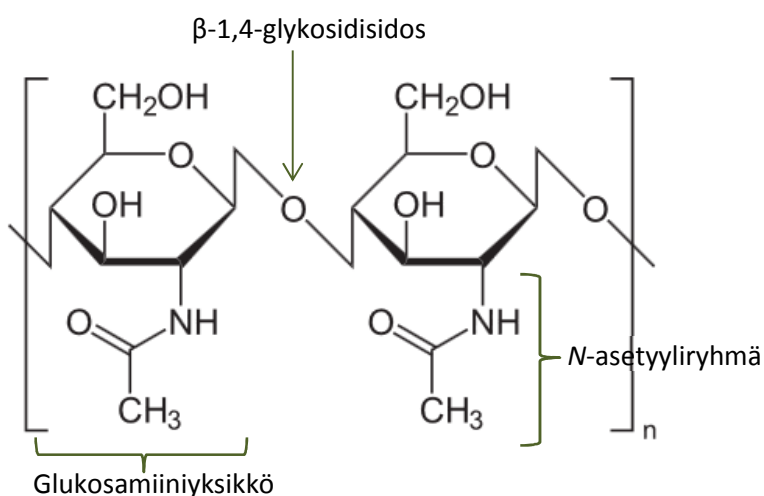
Solunulkoista ligniiniä tuottavassa kuusen (*Picea abies*) solususpensioviljelmässä on todettu voimakasta kitinaasigeenien ilmenemistä (Sundberg, Kärkönen ja Teeri 2010, julkaisematon) sekä kitinaasiaktiivisuutta (Porkka ym. 2013). Koska kasvien on havaittu tuottaneen kitinaaseja abioottisten ja bioottisten stressitilanteiden lisäksi myös kasvuun ja kehitykseen liittyvissä vaiheissa (Egertsdotter ym. 1995, Domon ym. 2000, van Hengel ym. 2002, Wiveger ym. 2003, von Arnold ym. 2005), ja kitinaasien kaltaisten geenien on huomattu olevan välttämättömiä selluloosasynteesissä, soluseinien ja johtosolukon kehityksessä sekä vaikuttavan ligniinin sijoittumiseen solukoissa (Johnston 2001, Zhong ym. 2002, Hossain ym. 2010, Sanchez-Rodriguez ym. 2012, Wu ym. 2012 ja 2013), on mahdollista, että aseptisen solukkoviljelmän kitinaasit ja kitinaasien kaltaiset entsyymit käyttävät substraattinaan jotakin muuta kuin patogeenin kitiiniä ja että solunulkoisen ligniinin tuotanto liittyy kitinolyyttisten entsyymien ilmenemiseen. Tutkimuksessa testattiin hiilihydraattimikrokalvomenetelmällä (carbohydrate microarray) erilaisia substraattivaihtoehtoja kuusen solukkoviljelmästä eristetyille kitinaaseille sekä heterologisesti tuotetulle kitinaasille ja kuusipuussa ilmenevälle kitinaasin kaltaiselle entsyymille. Substraattitestaus tapahtui Kööpenhaminan yliopistossa kasviglykobiologian osastolla professori William G. T. Willatsin ryhmän kehittämällä menetelmällä. Kitinaasien ja kitinaasien kaltaisen entsyymin ominaisuuksien ja substraattivaihtoehtojen kartoittamisella pyrittiin selvittämään kitinolyyttisten entsyymien merkitystä kuusi-solususpensioviljelmässä ja niiden mahdollista yhteyttä soluseinän kehitykseen.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Kitinaasientsyymit ja niiden substraatit

Kitinaasit ovat glykosyylihydrolaasientsyymejä, jotka katalysoivat homopolymeerisen kitiinin β -1,4-*N*-asetyyli-glukosamiini (GlcNAc) -yksiköiden pilkkoutumista glykosididoksistaan yleensä dimeerisiksi oligosakkarideiksi (kuva 1) (Hoell ym. 2010). Kitiiniä ei tavata kasveissa, mutta bakteerit, joidenkin sienien ja levien soluseinät ja selkärangattomien eliöiden kuoret sisältävät sitä runsaasti. Kitiini ja selluloosa muistuttavat toisiaan, mutta

kitiinillä asetamidiryhmä korvaa selluloosan glukoosiyksikön C2-asemassa olevan hydroksyyli ryhmän (Jang ym. 2004). Luonnon kitiinit ovat veteen liukenemattomia, ja ne koostuvat kitiinikuitujen lisäksi usein kovalenttisesti sitoutuneista proteiineista tai glukaaneista sekä kalsiumkarbonaatista (Stoykov ym. 2015). Kitiiniketjut ovat pakkautuneet joko vuorottain erisuuntaisesti 18 tai 25 ketjun kuiduiksi niin sanotuksi α -kitiiniksi, yhdensuuntaisesti β -kitiiniksi tai γ -kitiiniksi niin, että joka kolmas ketju on kahteen edelliseen nähden erisuuntainen (Gardner ja Blackwell 1975, Minke ja Blackwell 1978, Atkins 1985).

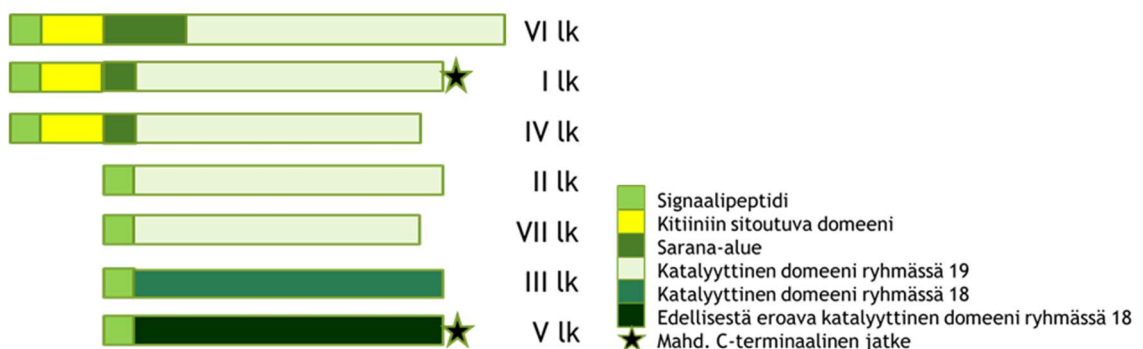


Kuva 1. Kitiiniketjun toistojakso.

Kitinaasisubstraattina voi toimia myös kitiinin deasetyloitu muoto, kitosaani sekä kitosaanin johdannainen, glykolikitosaani (Brunner ym. 1998, Libantova ym. 2009). Muita tunnettuja kitinaasisubstraatteja ovat juurinystyrä (nodulation, NOD) -tekijöiden lipokito-oligosakkaridit, joissa *N*-asetyyli-glukosamiinitetrapentameerirungon toisessa päässä *N*-sitoutunut rasvahappo korvaa asetyyli ryhmän, ja bakteriaalinen peptidoglykaani, joka on β -1,4-*N*-asetyyli-glukosamiini- ja *N*-asetyylimuramiinihappoyksiköstä sekä 3–5 aminohapon peptidiketjusta koostuva polymeeri (Brunner ym. 1998, Ovtsyna ym. 2000, Suarez ym. 2001). Lisäksi arabinogalaktaaniproteiinien (AGP) ja muiden soluseinän glukosamiini- tai *N*-glukosamiinitähteen omaavien glykoproteiinien tai glykaanien on arveltu pystyvän toimimaan substraattina kitinolyttisille entsyymeille (van Hengel 1998, Domon ym. 2000, Sanchez-Rodriguez ym. 2012).

2.2 Kitinaasien rakenne

Kitinaasit jaetaan rakenteensa, substraattispesifisyytensä, inhibiittoriherkkyytensä, isoelektrisen pisteensä ja solusijaintinsa mukaan glykosyylihydrolaasiryhmiin 18 ja 19 ja seitsemään eri luokkaan (kuva 2) (Collinge ym. 1993, Ubhayasekera ym. 2009, Islam ym. 2011, Grower 2012). Rakenneluokittelu on perustunut proteiinin kysteiinipitoisen kitiiniä sitovan alueen, sarana-alueen sekä karboksiterminaalisen pidennyksen olemassaoloon ja sijaintiin katalyyttiseen pääalueeseen nähden (Ubhayasekera 2010, Islam ym. 2011). C-pään pidennyksen on osoitettu toimivan vakuoliin osoittavana signaalina (Neuhaus ym 1991, Mitsunaga ym. 2004). Ryhmään 18 kuuluvat bakteereissa, sienissä ja joissakin kasveissa esiintyvät kitinaasiluokat III and V, joiden eksokitinaasit pilkkovat kitiiniä vain ketjun ei-pelkistävästä päästä. Ryhmän 19 kitinaasiluokkia I, II, IV, VI ja VII esiintyy pääasiassa kasveissa. Nämä katalyyttisen alueen sekvenssiltään varsin homologiset endokitinaasit hajottavat β -1,4-glykosidisia sidoksia kitiiniketjun sisältä. Esimerkiksi havupuiden kitinaaseja on tähän mennessä löydetty vain luokista I, II ja IV, mutta riisiltä (*Oryza sativa*) ja sokeriruo'olta (*Saccharum officinarum*) on tunnistettu myös ryhmään III ja japaninkäpypalmulta (*Cycas revoluta*) ja lituruoholta (*Arabidopsis thaliana*) ryhmään V kuuluvia kitinaaseja (Taira ym. 2009, Islam ym. 2011, Ohnuma ym. 2011, Guo ym. 2013, Su ym. 2014).



Kuva 2. Kitinaasiryhmien rakenteet (Islam ym:n 2011 mukaan).

Ryhmään 19 kuuluvilta muutamilta bakteerikitinaaseilta puuttuu substraattiin sitoutuvalla alueella useita silmukkarakenteita, jotka pidentävät kasvien substraattiin sitoutu-

via uria (Hoell ym. 2006). Ryhmät 18 ja 19 eroavat toisistaan sekvensseiltään, rakenteeltaan ja katalyyttiselta mekanismiltaan, mutta samaan ryhmään kuuluvilla kitinaaseilla on havaittu olevan keskenään samanlainen kolmiulotteinen rakenne ja samankaltainen hydrolyyttinen toimintamalli (Iseli ym. 1996, Ubhayasekera 2010, Grower 2012). Ryhmän 18 kitinaasien katalyyttiset β -laskosrakenteiset alueet käyttävät substraattiavusteista kaksoiskorvausmekanismia, joka säilyttää anomeerisen hiilen konfiguraation, kun taas ryhmän 19 kitinaasien katalyyttiset α -kierrerakenteiset alueet toimivat yksinkertaisella korvausmekanismilla, joka kääntää anomeerisen hiilen konfiguraation päinvas- taiseksi (Hoell ym. 2006). Seitsemään kitinaasiluokkaan luokitellut proteiinit kuuluvat vain kolmeen 17 tunnetusta patogeneesiin liittyvien proteiinien ryhmästä (pathogenesis related, PR) (Neuhaus ym. 1996, Kasprzewska 2003).

2.3 Kitinaasit bioottisen stressin yhteydessä

Monien tutkimusten mukaan kasvikitinaasien merkittävin tehtävä on toimia puolustusmekanismina patogeeneja vastaan (Collinge ym. 1993, Bishop ym. 2000, Veluthakkal ym. 2012). Kasvi alkaa tuottaa PR-proteiineja bioottisessa stressitilanteessa patogeenial- tistuksen kuten sienitautien tai kasvintuhoojahyönteisten hyökkäyksen uhatessa. Ki- tinaasien sienikasvuston leviämistä ehkäisevä vaikutus perustuu patogeenirihmaston kasvavissa kärjissä olevien paljaiden kehittyvien kristallisoitumattomien kitiiniketjujen alttiuteen kitinaasien hydrolyysille. Kitinaasien sienisoluseinästä irrottamien kito-oli- gosakkaridien sitoutuminen kasvin solukalvon reseptoriproteiineihin sekä kitiinin eli- sitointivaikutus laukaisevat useiden proteiinifosforylaatioiden ketjun ja MAPK-reaktio- sarjan aktivoinnin, mikä lopulta johtaa puolustusgeenien, kuten erilaisia hydrolyyttisiä entsyymejä koodaavien geenien ilmenemiseen (Langner ja Göhre 2016). Patogeenit voi- vat tosin ehkäistä tunnistumistaan muuntamalla kitiiniä deasetylaaseillaan vähemmän houkuttelevaksi kitosaaniksi (Oliveira-Garcia ja Valent 2015). Patogeenikitiiniin sitoutu- vat tehosteproteiinit voivat myös estää kasvikitinaaseja irrottamasta kito-oligosakkari- deja sienen soluseinästä tai eristää oligosakkaridit estäen signaali-vaikutusta, tai pato- geenien proteaasit voivat hajottaa kasvikitinaaseja (Oliveira-Garcia ja Valent 2015, Lang- ner ja Göhre 2016). Kasvikitinaasit voivat olla aktiivisia vasta kasvinsyöjäeliön ravinnoksi jouduttuaan ja hajottaa tuhoojan rakenteita hyönteisen suolistossa (Chen ym. 2008, Howe ja Jander 2008). Kuusen luokkaan IV kuuluvan kitinaasin on todettu ehkäisseen

voimakkaasti männynjuurikäävän (*Heterobasidion annosum*) kasvua (Ubhayasekera ym. 2009), ja kitinaasigeenien ilmenemisen on havaittu tartunnan jälkeen olleen voimakkaampaa sienelle vastustuskykyisillä kuusiklooneilla kuin sille herkillä klooneilla (Fossdal ym. 2006). Kuusenjuurikäävän (*Heterobasidion parviporum*) tunkeutumisen kuusisolukoon on osoitettu tehostaneen kuusen luokkaan IV kuuluvan kitinaasin ilmenemistä sekä kehittyvässä puussa että sekundaarisessa nilassa (Yaqoob ym. 2012). *Phellinus sulphureus* -sienitartunnan jälkeen on douglaskuusella (*Pseudotsuga menziesii*) havaittu II ja IV luokan kitinaasigeenien ilmenemisen voimistumista paikallisesti juurisoluissa ja systeemisesti neulassolukoissa (Islam ym. 2010). Valko- ja engelmanninkuusen risteymän (*Picea glauca* x *engelmannii*) sekä kontortamännyn (*Pinus contorta*) luokkaan I kuuluvien kitinaasien ilmeneminen on myös kasvanut voimakkaasti altistuksessa *Leptographium abietinum* - and *Grosmannia clavigera* -sienille sekä kuusella lisäksi männyn *Pissodes strobi* -kärsäkkäälle (Kolosova ym. 2014).

2.4 Kitinaasit ja abioottinen stressi

Abioottisten stressitekijöiden kuten kuivuuden, kuumuuden, osmoottisen stressin, kylmyyden, mekaanisen vioituksen, UV-säteilyn, raskasmetallien tai hapen puutteen on osoitettu johtavan kitinaasien ilmentymiseen (Grower 2012, Veluthakkal ym. 2012). Esimerkiksi Dongin ja Dunstanin (1997) tutkimuksessa valkokuusella (*Picea glauca*) luokan I kitinaasien geenien ilmeneminen on voimistunut kasvien altistuttua mekaaniselle vioitukselle, kuivuudelle ja tulvimiselle. Myös kuusen II ja IV luokan kitinaasitranskriptitasojen on havaittu kasvaneen mekaanisen vioituksen jälkeen (Hietala ym. 2004) ja useiden kitinaasi-isoentsyymien alkaneen kertyä solukoihin kuivuusstressin yhteydessä (Nagy ym. 2004). Kuusen ja okakuusen (*Picea pungens*) talvineulasten on todettu sisältäneen solunulkoista jäänestoaktiivisuutta omaavaa proteiinia, jonka N-pään sekvenssi on ollut yhdenmukainen havukasvien kitinaasien kanssa (Jarzabek ym. 2009), ja joillakin kylmissä oloissa tuottuvilla PR-proteiineilla kuten kitinaaseilla on tutkittu olleen sekä jäänesto- että sienitauteja ehkäiseviä vaikutuksia (Kuwabara ja Imai 2009). Dormanssiin liittyvien valkokuusen ja kuusen kitinaasien on lisäksi osoitettu osallistuneen jäätymis- ja patogeenivaurioiden ehkäisyyn ja typen varastointiin sekä edistäneen kasvun pysähtymistä edeltävää solujen kypsymistä (Gonzalez ym. 2015). Lituruoholla luokan III kitinaasigeenin on todettu ilmentyneen kasvin altistuttua mekaaniselle vioittumiselle,

korkealle suolapitoisuudelle, kylmyydelle, kuivuudelle, UV-säteilylle ja torjunta-aineille, mutta käsittelyn kitinaasi-inhibiittori allosamidiinilla yllättäen lisänneen kitinaasien ilmenemistä sekä stressinsietokykyä mahdollisesti bioottisten ja abioottisten stressivasteiden signalointireittien vuorovaikuttaessa keskenään (Takenaka ym. 2009).

2.5 Kitinaasit symbioosivuorovaikutuksessa

Kitinaasit toimivat osana kasvisolujen ja symbioottisten sienten tai bakteerien vuorovaikutusta, muun muassa sienijuurien ja juurinystyräbakteerien kehittymisessä. Tällöin kitinaasien arvellaan osallistuvan symbioosin tartunta- ja nystyränmuodostusvaiheita ohjaavien mekanismien säätelyyn, ja esimerkiksi kuusen kitinaasien on todettu pilkkoneen nystyränmuodostus (nodulation, NOD) -tekijöiden kito-oligosakkaridirunkoa niin, etteivät sienet aiheuta puolustusvasteita (Salzer ym. 1997). Toisaalta vaikka rhizobia- ja *Frankia*-typensidontabakteerien tuottamissa juurinystryöissä on tavattu luokkien I ja III kitinaaseja, Santos ym:n (2008) mukaan kitinaasien osallisuus mikrobien signaloinnin säätelijänä on kyseenalaista, koska *Frankia* ei muodosta kitiinipitoisia signaalimolekyylejä. Kuusisienjuurena toimivan punakärpässienen (*Amanita muscaria*) on osoitettu lisänneen kuusen juurien sekä kuusisoluviljelmän kitinaasiaktiivisuutta, minkä on myös arveltu edistäneen molempien osapuolten aineenvaihduntatuotteiden vaihtoa sienen soluseinien kitiinirakenteiden osittain hajotessa (Sauter ja Hager 1989). Kuusen neulasten korkean typpipitoisuuden onkin todettu liittyneen juurten suureen kitinaasiaktiivisuuteen erityisesti *Wilcoxina*-pintasienijuuren läsnä ollessa (Velmala ym. 2014). Palikkamailasella (*Medicago truncatula*) Saltzer ym. (2000) ovat havainneet kitinaasigeenien ilmenneen sienijuuria muodostaneessa juuristossa patogeeneihin reagoivien kitinaasien jäätyä ilmentymättä ja Bonanomi ym. (2001) ovat paikallistaneet tietyn III luokan kitinaasin ainoastaan keräsienijuuria muodostavan juuriston soluista. Kitinaasien on todettu olleen lipokito-oligosakkaridien suhteen substrattispesifisiä esimerkiksi sulfaatin, fuksylaation tai glykosidisen sidoksen sijainnin mukaan (Schultze ym. 1998, Ovtsyna ym. 2000).

2.6 Kitinaasit signaloinnin osana

Kitinaasien ajatellaan osallistuvan kasvien sisäiseen viestintään vapauttamalla kito- ja mahdollisesti kitosaanioligosakkarideja signaalimolekyyleiksi kalvoreseptorien aistittaviksi laukaisemaan erilaisia vasteita, kuten proteiinien fosforylaation, fytoaleksiinien biosynteesin, puolustusgeenien transkriptionaalisen aktivoinnin, oksidatiivisen purkauksen tai solunjakaantumisen lisääntymisen (Kim ym. 2000, Day ym. 2001). Litu- ruoholla kitiiniyksiköiden on arveltu edistäneen kasvin sisäistä puolustuskykyä pato- geeneja vastaan ja näin tehostaneen vastustuskyvyn kehittymistä (Wan ym. 2004 ja 2008). Pääasiallinen kitiiniä sitova proteiini ja kitiinin aikaansaaman fosforylaation kohde on lituruoholla LysM-RLK CERK1, jonka tiedetään osallistuvan kitiinin laukaisemaan puo- lustusvastesignointiin (Petutschnig ym. 2010, Brotman ym. 2012). Riisillä Shimizu ym. (2010) ovat havainneet kitiinisignointiin tarvittavan sekä solukalvon CEBiP-glykoprotei- iinin että LysM-RLK OsCERK1- proteiinin. Soijapavulla (*Glycine max*) kitotetraoosin on havaittu olleen pienin reseptoriin sitoutumaan kykenevä polymeeriyksikkö, kun taas ok- tameerien on todettu synnyttäneen intensiivisempää soluvastetta (Day ym. 2001). Myös riisin kitiinipuolustussignaloinnin on todettu toimivan pidemmällä asetyloituneella oli- gosakkaridiketjulla, kuten kitiinihepta- tai oktameerilla (Kaku ja Shibuya 2016). Käpypal- mun V luokan kitinaasilla, joka ei ole sienipatogeeneille aktiivinen, on ainoana kasvi- kitinaasina havaittu transglykosylaatioaktiivisuutta, jonka on arveltu epäsuorasti liitty- vän patogeenu puolustukseen (Taira ym. 2009 ja 2010). Esimerkiksi valmistamalla pienen polymerisaatioasteen kito-oligosakkarideista suuremman polymerisaatioasteen yksi- köitä transglykosyloivat kitinaasit voisivat tuottaa suuremman elisitointivaikutuksen ja voimakkaamman puolustusvasteen. Paprikan (*Capsicum annuum*) IV luokan kitinaasin on lisäksi havaittu vuorovaikuttavan suoraan reseptorinkaltaisen soluliman proteiini- ki- naasin kanssa (Kim ym. 2015).

2.7 Kasvin kehitykseen liittyvät kitinaasit

Kitinaasien jatkuvan ilmentymisen tietyissä kasvinosissa on arveltu johtuvan niiden eri- tyisestä herkkyydestä patogeeneille tai kitinaasien osallisuudesta alkion elinten aiheiden erilaistumista säätelevien signaalimolekyylien toimintaan. Kitinaasien ilmenemisen on havaittu olleen yhteydessä solujen jakaantumiseen, erilaistumiseen ja kehitykseen.

Luokkaan IV kuuluvien kuusikitinaasien on huomattu tehostaneen kuusen suvuttomien alkioiden kasvua solukkoviljelmissä (Egertsdotter ja von Arnold 1998). Kitinaaseille herk-
kien lipokito-oligosakkaridien on todettu toimineen signaalimolekyylinä edistäen kuu-
sen esialkiosolukon kasvua ja varhaista kehitystä (Dyachok ym. 2002). Kuusen IV luokan
Chia4-Pa-kitinaasiperheen jäsenten on arveltu säätelevän esialkioiden kehittymistä su-
vuttomiksi alkioiksi edistämällä suoraan tai epäsuorasti niiden ohjattua solukuolemaa,
ja niiden on todettu ilmenevän hoitajasoluissa muttei varsinaisissa alkioissa. Näiden ki-
tinaasien on esitetty toimivan myös megagametofyyttisignaloinnissa (Wiveger ym.
2003). Von Arnold ym. (2005) ovat puolestaan arvelleet kuusen solunulkoisten ki-
tinaasien tuottavan sekä hajottavan lipokito-oligosakkarideja, joiden on havaittu ehkäis-
seen kuusen esialkiosolukon ohjattua solukuolemaa. Karibianmännyn (*Pinus caribaea*)
arabinogalaktaaniproteiinien ja kitinaasien on tutkittu vuorovaikuttaneen keskenään al-
kioita kehittävässä solukoissa (Domon ym. 2000). Porkkanan (*Daucus carota*) kitinaasit
ja arabinogalaktaaniproteiinit ovat edistäneet suvutonta alkionkehitystä, ja asetyyloglu-
kosamiiniosan sisältävien arabinogalaktaaniproteiinien on arveltu toimivan endoki-
tinaasien luontaisena substraattina (Kragh ym. 1992, van Hengel 1998, van Hengel ym.
2002). IV luokan kitinaasin on havaittu ilmenneen suvuttoman alkionkehityksen aikana
myös lituruohon hoitajasoluissa alkioiden ympärillä sekä myöhemmin juurten päällyske-
tossa ja juurikarvojen esiasteissa (Passarinho ym. 2001). Parananaraukarian (*Araucaria
angustifolia*) alkioita kehittävä viljelmän on havaittu erittävän viljelyalustaan luokan IV
kitinaaseja (Wendt dos Santos ym. 2009), ja dos Santos ym. (2006) ovat todenneet arau-
karian siementen kaikkien kehitysvaiheiden sisältävän kitinolyyttistä aktiivisuutta omaa-
via proteiineja mutta IV luokan kitinaasien ilmentymistä vain siementen myöhäisissä ke-
hitysvaiheissa. Fraterova ym. (2013) ovat tutkineet euroopanmustamännyn (*Pinus
nigra*) ja pihtaristeymien (*Abies hybr.*) alkioita kehittävien solukoiden viljelyalustojen ki-
tinaasien kytköstä solukoiden alkiontuotantotasoon ja havainneet, ettei kitinaaseja
voitu kuitenkaan pitää kallusviljelmien alkiontuotantokyvyn mittarina. Lituruohon so-
lususpensioviljelmän protoplasteista analysoiduista soluseinän uusiutumiseen liittyvistä
solunulkoisista proteiineista on löydetty kaksi kitinaasia, joista toisen on tiedetty liitty-
vän stressiin mutta toisen havaittu olevan yhdenmukainen lehmänpavun (*Vigna ungui-
culata*) soluseinän mekaanisia ominaisuuksia säätelevän yieldin-proteiinin kanssa (Kwon
ym. 2005).

2.8 Kitinaasien kaltaiset proteiinit

Kitinaasien kaltaisten (chitinase-like, CTL) entsyymien ryhmään kuuluvat proteiinit ovat sekvenssiltään ja rakenteeltaan suuresti kitinaasinomaisia, mutta ne eivät välttämättä sitoudu kitinaasisubstraatteihin tai pysty pilkkomaan niitä. Niiden katalyyttiselle aktiivisuudelle oleelliset aminohapot poikkeavat kitinaasien vastaavista geenien kahdentumisen ja sitä seuranneen mutaation/mutaatioiden vuoksi, eikä niillä yleensä ole kitinolyttistä aktiivisuutta, vaikka ne sitoutuvat usein glukaanipohjaisiin substraatteihin (Martinez-Caballero ym. 2014, Kesari ym. 2015). Kitinaasin kaltaisten proteiinien toiminnot ovat osin samankaltaisia kitinaasien tehtävien kanssa, mutta mutaatiot ovat johtaneet lisäksi monitoimintoihin entsyymeihin (Kesari ym. 2015). *CTL*-geenituotteiden on arveltu säätelevän myös vasteita, joita kitiiniligosakkaridit normaalisti välittävät (Zhang ym. 2004).

CTL-geeniryhmä on ollut huomion kohteena erityisesti mahdollisesta osallisuudestaan kasvisoluseinän muodostumiseen (Hossain ym. 2010). Lituruohon *Atct1*-geenimutaatio on havaittu aiheuttaneen vaillinaisesti muodostuneita primääriseiniä, epämuotoisia soluja ja ektooppista ligniininmuodostusta kukkavarsien ytimen soluissa, muutoksia juurten pituudessa, ja etyleenin ylituotantoa (Johnston 2001, Zhong ym. 2002). *AtCTL1*-proteiinien on tutkittu vaikuttaneen lituruohon selluloosan biosynteesiin ja arveltu säätelevän selluloosan esiintymistä ja vuorovaikutusta hemiselluloosan kanssa sitoutumalla selluloosasäikeisiin (Sanchez-Rodriguez ym. 2012). Niiden on myös todettu osallistuneen juuristorakenteen muunteluun vasteena ympäristöoloille (Hermans ym. 2010 ja 2011). Lisäksi *Atct1*-geenimutaatiota kantaneella lituruoholla on todettu poikkeavaa suola- ja kuivuusstressin sietokykyä sekä runsasta natriumin kerääntymistä soluihin, mikä viittaa CTL-proteiinien osallisuuteen myös abioottisen stressin sietokyvyssä (Kwon ym. 2007). Lituruohon *Atct2*-geenimutaatio on edistänyt ligniinin kertymistä etioloituneiden taimien alkeisvarsiin (Hossain ym. 2010) ja aiheuttanut häiriöitä johtosolukon erilaistumisessa (Johnston 2001). Kahvipensaan (*Coffea arabica*) luontaisesti inaktiivisen kitinaasinkaltaisen CaclXIP-ksylanaasi-inhibiittoriproteiinin on havaittu ehkäisevän ruosteitiöiden kehittymistä, ja sen on arveltu kehittyneen toimimaan ksylanaasi-inhibiittorien lailla kasvin puolustusmekanismina (Vasconcelos ym. 2011). Sitä vastoin riisin ki-

tinolyttisesti aktiivisen OsCLP-proteiinin on todettu olevan sekvenssiltään yhdenmukainen ksylanaasi-inhibiittorin kanssa ilman estovaikutusta ksylanaasien toimintaan (Wu ym. 2013). Riisin *ctl*-geenimutaatio on vähentänyt selluloosan määrää ja mekaanista kestävyyttä ilman vaikutusta kasvuun (Wu ym. 2012). Teksasinpuuvillan (*Gossypium hirsutum*) *CTL*-geenien on osoitettu ilmentyneen eniten kuitujen sekundääriseinien muodostuessa ja niiden CTL-proteiinien liittyneen enemmän kitiinioligosakkarideihin sitoutumiseen kuin katalyysiin (Zhang ym. 2004). Kuitupellavalla (*Linum usitatissimum*) kolmen *CTL*-geenin ilmeneminen on lisääntynyt merkittävästi selluloosapitoisten hyytelö-mäisten sekundäärisoluseinien muodostuessa kuidun kehittyessä mutta ollut samalla suhteellisesti alhainen primäärisoluseinällisissä solukoissa sekä ksylaanityypin sekundääriseinää muodostaneessa puussa. Lisäksi pellavan kolmen muun *CTL*-geenin ilmentyminen puussa on tapahtunut yhtäaikaisesti sekundääriseinätyypin selluloosasynteesigeenien ilmenemisen kanssa (Mokshina ym. 2014).

2.9 Kitinaasit solukkoviljelyn yhteydessä

Soluviljelmän tasaisten optimiolojen ylläpitäminen voi olla haastavaa, ja kitinaasien ilmenemiseen viljelmässä saattavat vaikuttaa monet abioottiset stressitekijät, kuten mekaaninen vioittuminen, kuivuus tai osmoottinen stressi. Koska soluviljelmissä kasvunopeus on suuri, kitinaasien ilmeneminen voi liittyä myös kasvuston kehityksellisiin vaiheisiin. Virginiantupakan (*Nicotiana tabacum*) *in vitro* -viljelmissä on havaittu luokan I kitinaasin tuottuneen kasvihormonittomassa viljelyalustassa ja auksiinin ja sytokiiniin yhtäikäisen läsnäolon ehkäisseen geenien ilmenemistä (Shinshi ym. 1986, van Buuren ym. 1992). Kurpitsan (*Cucurbita* sp.) solususpensioviljelmässä alustaan erittyvän kitinaasin ilmeneminen on ollut riippumatonta auksiinin määrästä mutta voimakkaimmillaan kallussoluissa, ja Arie ym. (2000) ovat todenneet myös siirtogeenisen virginiantupakan BY-2-solujen ilmentävän ja erittävän alustaan kurpitsan kitinaasia. Loblolly-männyn (*Pinus taeda*) solukkoviljelmässä on osoitettu alustaan erittyvien kitinaasien ilmentymisen olleen jatkuvaa solunsisäisten kitinaasien ilmenemisen ollessa indusoituvaa. Kuitenkin molemmat kitinaasitasot ovat nousseet viljelmän ikääntyessä sekä kitosaanielisitaation jälkeen, jolloin solunsisäisten kitinaasien ilmeneminen on lisääntynyt viljelmän tuotaman etyleenin kanssa samassa suhteessa mutta erittyneiden kitinaasien määrä on

noussut itsenäisesti (Popp ym. 1996). Lippman ym. (2009) ovat tunnistaneet virginian-tupakan solususpensioviljelmän viljelyalusta-analysissä lukuisia stressiin liittyviä proteiineja, joissa kitinaasien osuus on ollut 13 %, kun tunnistetut alustan proteiinit on luokiteltu niiden oletettujen toimintojen mukaan UniProt-proteiinitiedoston avulla. Lisäksi riisin solususpensioviljelmän on tutkittu erittäneen viljelyalustaan 11 eri kitinaasia luokista I, II ja III ilman elisitointia tai patogeenialtistusta (Park ym. 2002). Vaikka silmämääräisesti bioottista stressitekijää ei varmasti havaittaisikaan, on myös mahdollista, että kitinaasien tai ligniinin erittyminen solukkoviljelmään puolustusvasteena johtuisi kasvien sisäisestä mikrobivälisestä, jonka tunnistamiseksi esimerkiksi Pirttilä ym. (2002) ovat käyttäneet männyn solukkoviljelmässä *in situ* -hybridisaatiomenetelmää.

2.10 Kitinaasien hyödyntäminen

Viime aikoina kitinaaseihin on kiinnitetty paljon huomiota niiden hyödyntämismahdollisuuksien vuoksi. Kasvipäristen kitinaasien suuria kaupallisia käytännön sovelluksia ei tähän mennessä kuitenkaan vielä ole, vaan tutkimus on keskittynyt lähinnä sieni- ja bakteeriperäisiin kitinaaseihin. Koska sienissä, hyönteisissä ja äyriäisissä kitiini on soluseinän rakenneosana, niiden kitinaasien perustoiminto puolustuksen ohella on kitiinin muokkaus solukoiden erilaistuessa ja uusiutuessa (Gooday ym. 1992, Hoel ym. 2013, Rathore ja Gupta 2015). Bakteerikitinaasien tehtävät liittyvät pääasiassa kitiinin hajottamiseen hiilen ja typen tuottamiseksi solun aineenvaihduntaan sekä loisintaan (Patil ym. 2000, Ad-rangi ja Faramarzi 2013, Rathore ja Gupta 2015). Kitiiniä pilkkovien entsyymien hyödyntämistä ovat rajoittaneet korkeat tuotantokustannukset ja alhaiset tuotantomäärät (Chavan ja Deshpande 2013). Muun muassa kitinaasien indusoituva luonne, heterologisesti tuotettujen entsyymien aktiivisuusongelmat sekä substraattivaihtoehtojen suuri määrä ovat tekijöitä, jotka ovat hidastaneet kitinaasisovellusten kehitystä (Stoykov ym. 2015).

Kitiini on selluloosan jälkeen toiseksi runsain biopolymeeri maailmassa, ja sen vaikeasti hajoava koostumus tuottaa ongelmia esimerkiksi jätteenkäsittelyssä ja kasvintuhoojien suojarakenteissa. Kitinaasipohjaisia ratkaisuja on kehitetty elintarviketeollisuuteen kala- ja äyriäisjätteen tuhoamiseen sekä maatalouteen kasvitautien ja tuholaisten biologiseen torjuntaan kitinaaseja sisältävillä torjunta-aineilla ja siirtogeenisillä kasveilla (Koga 2005,

Chavan ja Deshpande 2013, Nagpure ym. 2014, Stoykov ym. 2015). Kitinaasien avulla entsyymaattisesti pilkkotuille biologisesti aktiivisille kito-oligomeereille on löydetty uusia lääketieteellisiä käyttötarkoituksia muun muassa niiden verenpainetta alentavien, kasvaimia hiilitsevien ja haavanhoitovaikutuksiensa vuoksi (Liang ym. 2007, Anitha ym. 2014, Rathore ja Gupta 2015). Ihmisen kitinolyyttisesti aktiivisia sekä kitinaasien kaltaisia proteiineja on viime aikoina tunnistettu ja ryhdytty käyttämään joidenkin sairauksien merkkiaineina (Bargagli ym. 2007, Kastrup 2012, Nagpure ym. 2014). Kitinaaseja käytetään myös sieniprotoplastituotannossa bioteknisiin sovelluksiin ja elintarviketeollisuudessa tannaasien vapauttamiseen (Peberdy 1989, Barthomeuf ym. 1994, Nagpure ym. 2014, Stoykov ym. 2015). Lisäksi kitinaaseihin perustuvia menetelmiä on ehdotettu käytettäväksi maan tai kasvualustan sienikasvuston olemassaolon ja aktiivisuuden määrittämiseen sekä ihmisen sienitartuntojen diagnosointiin (Miller ym. 1998, Laine ja Lo 2000). Biopolttoaineiden tuotannon kehittämisessä kasvimateriaalin rakennepolysakkaridien hajottaminen entsyymaattisesti on vaihe, johon on haettu mallia kitinaasien toiminnasta kitiinisubstraatilla (Eijsink ym. 2008).

Siitä huolimatta, että kitinaaseja on mahdollista eristää useista kasveista, bioteknologian näkökulmasta on todettu olevan helpointa kloonata kitinaasigeeni tuotto-organismiin, joka voi ilmentää entsyymiä ilman substraatin läsnäoloa (Stoykov ym. 2015). Siirtämällä sienisoluluseinää hajottavien entsyymien kuten kitinaasien tai glukanaasien geenejä viljelykasveihin on luotu sienitaudeille vastustuskykyisiä siirtogeenisiä hyötykasvilajikkeita, ja kasviperäisiä kitinaasigeenejä on menestyksekkäästi yli-ilmennetty muun muassa tomaatissa, perunassa, maississa, puuvillassa, vehnässä ja riisissä joko yksin tai muiden PR-proteiinien kanssa (Ceasar ja Ignacimuthu 2012, Cletus ym. 2013). Koska ryhmän 19 kitinaaseilla on havaittu olevan suhteellisen heikko aktiivisuus kitiiniin kristallisoituneeseen muotoihin (Hoell ym. 2006), kasviperäisten kitinaasisiirtogeenien vaikutus kasvintuhoojiin on ollut vähäisempää, mutta esimerkiksi poppelin (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) kitinaasigeenin ilmentymisen tomaatin (*Lycopersicon esculentum*) lehdistä on todettu ehkäisevän koloradonkuoriaisen (*Leptinotarsa decemlineata*) lisääntymistä (Lawrence ja Novak, 2006). Virginiantupakan kitinaasigeeniä yhdessä *Bacillus thuringiensis* -bakteerin *cry1Ac*-geenin kanssa on kehitetty suolistovaikutteiseksi tuholaistorjunta-aineeksi tartuttamaan tauteja levittäviä hyttyslajeja (Ding ym. 2007). Ryhmän 18 bakteerikitinaaseilla tavattavaa transglykosylaatioaktiivisuutta on löydetty japaninkäpypalmun

V luokan kitinaasista. Toimintamekanismin pohjalta kehitetyn tryptofaanisivuketjun li-säyksen V luokan kitinaasiin on todettu edistäneen sen transglykosylaatioaktiivisuutta sekä lituruoholla että japaninkäpypalmulla (Taira ym. 2010, Umemoto ym. 2013 ja 2015), mitä saattaisi olla mahdollista hyödyntää halutun mittaisten kito-oligomeerien valmistuksessa.

Vaikka teollisuudessa kitiinioligosakkarideja on tuotettu hydrolysoimalla kitiiniä hapolla tai entsyymaattisesti, entsyymaattinen synteesi luokan 18 kitinaasien avulla säätelee tehokkaammin *N*-asetyyli-glukosamiiniketjujen pituutta (Taira ym. 2010, Umemoto ym. 2013). Useiden mikro-organismien on raportoitu tuottavan suuria pitoisuuksia solunulkoisia kitinolyttisiä entsyymejä ainoastaan käytettäessä fermentoinnissa nestemäistä substraattia, vaikka kiinteän substraatin fermentointimenetelmää pidetään huomattavasti tuottoisampana, vähäpäästöisempänä ja yksinkertaisempana (Chavan ja Deshpande 2013).

Biopolttoainetutkimuksessa kitinaasien rakenteellisista ominaisuuksista tärkeimmät ovat prosessoitavuus eli kyky pysyä substraattiin sitoutuneena hydrolyyttisten reaktioiden välillä ja taipumus pilkkoa polymeerisubstraattia järjestelmällisesti suuntautuen. Prosessoitaville glykosidaaseille on ominaista niiden substraattia sitovien uurteiden ja pintojen linjautuminen aromaattisten aminohappotähteiden, erityisesti tryptofaanin kanssa. Aromaattisilla ketjuilla on oleellinen merkitys prosessoitaville kitinaaseille substraattiin sitoutumisen säätelyssä, mutta ei-prosessoitavilla, kuten ryhmän 19 kitinaaseilla ne ovat paljon harvinaisempia (Sørli ym. 2012). Kitinolyttisten mikro-organismien on myös todettu tuottavan ei-hydrolysoivia avustavia proteiineja, jotka lisäävät entsyymaattista tehokkuutta (Eijsink ym. 2008). *Serratia marcescens* -enterobakteerin kitinolyttinen entsyymikoneisto on parhaiten tunnettuja liukenemattomien polysakkariidien hajotusjärjestelmiä, jonka toimintamallia yritetään soveltaa muihin entsyymeihin, erityisesti selluloosan muokkaukseen sellulaasien ja lyyttisten polysakkaridimono-oxygenaasien avulla (Vaaje-Kolstad ym. 2013). Kitinaasien mahdollinen kytkös kasvisoluseinän kehitykseen ja selluloosasynteesiin saattaisi luoda uuden näkökulman soluseinä-, selluloosa- ja ligniinitutkimukseen.

2.11 Solunulkoista ligniiniä tuottava kuusisolukko A3/85

Työssä käytetty kuusisolukko A3/85 on alun perin lähtöisin Kaakkois-Suomesta Virolahdelta vuonna 1985 kerätyn kävyn kypsymättömästä alkioista (Simola ym. 1992). Kuusikalluslinja sisältää lehtivihreää ja erittää alustaan solunulkoista ligniiniä. Solukkolinjaa on hyödynnetty useissa ligniinitutkimuksissa (Brunow ym. 1993, Koutaniemi ym. 2005 ja 2007, Kärkönen ym. 2002, 2009 ja 2014, Kärkönen ja Fry 2006). Solunulkoisen, alustaan vapautuneen ligniinin on todettu olevan rakenteeltaan puusta jauhetun soluseinä-ligniinin ja koniferyyialkoholista vetyä poistamalla valmistetun synteettisen ligniinin väli-muoto (Brunov ym. 1993). Se sisältää soluseinä-ligniiniä runsaammin *p*-hydroksifenyyliyksiköitä ja fenolisia ryhmiä, ja sen arvellaan olevan hyvin haaroittunutta. A3/85-kuusisolulinjan viljelyalustassa on havaittu myös voimakasta kitinaasigeenien ilmene-mistä ja kitinolyyttistä aktiivisuutta liukoille glykolikitiinille sekä karboksimeyylikitiinille.

3 Tutkimuksen tavoitteet

Koska kitiiniä esiintyy kasvipatogeenien rakenteissa mutta ei kasveissa ja tutkimusmate-riaalina olleen aseptisen kuusisoluviljelmän kasvatusolot olivat vakaat, tutkimushypo-teesinani oli, että kaikki viljelyalustaan erittyneet kitinaasit eivät olleet seurausta stres-sistä, vaan ainakin osa niistä liittyi kehitykseen ja toimi patogeenikitiinin lisäksi myös jol-lakin kuusiperäisellä polysakkaridisubstraatilla. Lisähypoteesina oli viljelmän runsaan ki-tinaasi- ja kitinaasin kaltaisten geenien ilmenemisen yhteys kyseisen kuusisolulinjan so-lunulkoisen ligniinin tuotantoon. Tutkimuksen tarkoituksena oli kartoittaa kuusisoluvil-jelmän alustan ja kehittyvän puun kitinaasien ja kitinaasien kaltaisten entsyymien omi-naisuuksia eristämällä, puhdistamalla ja kloonamalla niitä ja tuottamalla niitä heterolo-gisesti. Tavoitteena oli myös tunnistaa kitinaasien ja kitinaasin kaltaisten proteiinien substraatteja, jotta kitinaasien merkitys kuusisolukon kehityksessä ymmärrettäisiin pa-remmin.

4 Aineisto ja menetelmät

4.1 Kitinaasien eristys kuusisolususpensioviljelmän alustasta

Koska kuusisolususpensioviljelmän alustassa oli todettu poikkeuksellisen suurta kitinaasigeenien ilmentymistä (Sundberg, Kärkönen ja Teeri 2010, julkaisematon) ja kitinolyttistä aktiivisuutta (Porkka ym. 2013), kitinaaseja pyrittiin eristämään siitä erilaisin kromatografisin menetelmin ja luonnehtimaan niitä koon, kitinaasiluokan ja entsyymiaktiivisuuden suhteen.

4.1.1 Kitinaasien puhdistus

Kuusisolususpensioviljelmän alustaan erittyneet kitinaasit pyrittiin erottamaan muista proteiineista ja alustakomponenteista. Puhdistus aloitettiin proteiinien ammoniumsulfaattisaostuksella, minkä jälkeen jatkettiin kitinaasien erottamista muista proteiineista affiniteetti- ja kationinvaihtokromatografisesti. Koska jatkoanalyysissä tarkasteltiin kaikkiaan yhdeksää eri puhdistusvaiheen tuotetta, niissä käsiteltävät entsyyminäytteet nimettiin koodeilla E1-E9 (taulukko 1), jotta viittaus niihin sekä menetelmä- että tulokuvauksissa olisi selkeämpää.

Taulukko 1. Työssä tarkasteltavien entsyymien koodit ja alkuperä.

Koodi	Alkuperä
Kuusisolususpensioviljelmän entsyymit	
E1	Kuusisolususpensioviljelmän puhdistamaton alusta
E2	Kitiinihelmiäpylvään kiinnittymättä ohittaneet kuusisoluviljelmän alustan proteiinit
E3	Kitiinihelmiäpylvääseen sitoutuneet kuusisoluviljelmän alustan proteiinit
E4	Kationinvaihtokromatografisesti puhdistettu kitiiniäpylvääseen sitoutunut kuusisoluviljelmän kitinaasi K1
E5	Kationinvaihtokromatografisesti puhdistettu kitiiniäpylvääseen sitoutunut kuusisoluviljelmän kitinaasi K3
<i>Pichia pastoris</i> -hiivassa tuotetut entsyymit	
E6	Kitiinihelmiäpylvääseen sitoutuneet <i>P. pastoris</i> -hiivassa tuotetut kitinaasit
E7	Kationinvaihtokromatografisesti erotetut <i>P. pastoris</i> -hiivassa tuotetut kitinaasit
E8	Metalli-ioni-affiniteettikromatografialla erotetut <i>P. pastoris</i> -hiivassa tuotetut kitinaasinkaltaiset proteiinit
E9	Geelisuodatuksella erotetut <i>P. pastoris</i> -hiivassa tuotetut kitinaasinkaltaiset proteiinit (ja muita proteiineja)

Konsentroidun kuusen solususpensioviljelyalustan (E1, 16 ml) proteiinit saostettiin ammoniumsulfaatilla (Sigma-Aldrich, A3920, USA) 70 %:n kyllästymisasteelle (472 g/l). Pro-

teiniin liukoisuus vähenee ja saostuminen kasvaa proteiinispesifisesti liuoksen suolapitoisuuden kasvaessa. Seosta sentrifugoitiin 17 000 g:n painovoimalla 4 °C:ssa 1 h. Proteiinipelletti liuotettiin 20 mM natriumsitraattifosfaattipuskuriin pH 5,3, minkä jälkeen puskuri vaihdettiin PD-10-pylväillä (GE Healthcare, 17-0851-01, Iso-Britannia) valmistajan ohjeen mukaan 50 mM Tris-HCl:ksi pH 8,0.

20 ml:n kitiinihelmiresiini (New England BioLabs, S6651S, USA) Econo-pylväässä (2,5 x 20 cm, Bio-Rad, 7372522, USA) tasapainotettiin viisinkertaisella resiinitilavuudella 50 mM Tris-HCl-puskuriliuosta pH 8,0. Ammoniumsulfaattisaostetut proteiinit siirrettiin kitiinipylvääseen, johon näytteen kitinaasien odotettiin sitoutuvan. Resiiniä pestiin 140 ml:lla tasapainotuspuskuria, kunnes pylväästä ulos tulleen liuoksen proteiinipitoisuutta kuvaava absorbanssia aallonpituudella 280 nm mittaava arvo (A_{280}) (Shimadzu UV-2100 Spectrophotometer, Japani) laski lähelle nollaa. Virtaus tapahtui painovoimaisesti nopeudella 2 ml/min koko ajon ajan. Pylvääseen tarttuneet proteiinit eluointiin 20 mM etikkahapolla pH 3,2. Proteiinia sisältäneet jakeet erotettiin mittaamalla A_{280} -arvo (GeneQuant 1300, 4281 V1.6 Spectrophotometer, Ruotsi). Niille tehtiin välittömästi puskurinvaihto PD-10-pylväillä 20 mM natriumsitraattifosfaattipuskuriksi pH 7,6, ja proteiinit konsentroitiin Makrosep 3K MWCO -pylväillä (Pall, MAPOO3C37, USA) 2 ml:ksi (= E3) 4 000 g:n painovoimalla (Eppendorf Centrifuge, 5180R, Saksa) 4 °C:ssa. Myös kitiinihelmi-pylvään kiinnittymättä ohittaneet proteiinit otettiin talteen ja konsentroitiin 5 ml:ksi (= E2) kuten eluaatti. Niiden puskuri vaihdettiin 50 mM natriumasetaattipuskuriksi pH 5,0 kuten aiemmin.

20 ml:n heikko kationinvaihtajaresiini (CM Sepharose FF, Sigma-Aldrich, CCF100, Ruotsi) HR16/10-pylväässä (GE Healthcare, Ruotsi) ÄKTAprime-nestekromatografilaitteessa (18-1137-18, GE Healthcare, Ruotsi) tasapainotettiin viisinkertaisella resiinitilavuudella 20 mM natriumsitraattifosfaattipuskuria pH 7,6. Pylvääseen syötettiin 1 ml kitiinihelmi-pylvään eluaattia, jonka positiivisesti varautuneiden proteiinien odotettiin sitoutuvan negatiivisesti varautuneeseen resiiniin. Resiiniä pestiin tasapainotuspuskurilla, ja ajoa jatkettiin virtausnopeudella 0,5 ml/min, kunnes pylvääseen kiinnittymättömät proteiinit olivat huuhtoutuneet pois ja A_{280} -arvo oli palautunut lähelle nollaa. Näyteproteiinien eluointi pylväästä tapahtui nostamalla natriumsitraattifosfaattijopuskurin NaCl-pitoisuutta tasaisesti 0 M:sta 0,4 M:iin 2 ml:n näytejakeita keräten. Proteiinia sisältäneet 14

jaetta muodostivat kromatogrammiin kaksi huippua, jotka erotettiin toisistaan. Eluaatit konsentroitiin 1,5 ml:ksi (= E4 ja E5) ja puskuri vaihdettiin 50 mM natriumasetaattipuskuriksi pH 5,0 kuten aiemmin. Kaikkien entsyyminäytteiden proteiinipitoisuudet (taulukko 3) määritettiin karkeasti mittaamalla konsentraattien A_{280} -arvot.

4.1.2 SDS-PAGE- ja entsyymiaktiivisuusanalyysi

Kromatografisesti kuusisolususpensioviljelmän alustasta erotettujen proteiinien määrän ja koon selvittämiseksi ne analysoitiin denaturoivalla natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesilla (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). Samalla niiden kitinolyyttistä aktiivisuutta tarkasteltiin glykolikitiiniä sisältävän polyakryyliamidigeelin avulla.

Puhdistetut proteiinit analysoitiin denaturoivalla SDS-PAGE:lla käyttäen Laemmliin menetelmää (Laemmli, 1970), jossa proteiinit erottuvat molekyylipainonsa perusteella SDS-molekyylien aiheuttaman suuren negatiivisen varauksen peittäessä proteiinien alkupe räiset varaukset alleen. Näytteet denaturoitiin keittämällä niitä 5 min latauspuskurissa (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 25 % (v/v) glyseroli, 2 % (w/v) SDS, 0,01 % (w/v) bromofenoli-sini, 5 % (v/v) β -merkaptoetanoli) ennen niiden siirtoa geelille, jolloin pelkistävä merkaptoetenoli hajotti proteiinien rikkisillat. 4–15 % gradienttigeeliä (Mini-Protean TGX, Bio-Rad, 456-1083, USA) ajettiin Mini-Protean Tetra Cell -laitteistolla (Bio-Rad, Kiina) 200 V:n jännitteellä 30 min, minkä jälkeen geeli käsiteltiin PageBlue Protein Staining Solution-liuoksella (Thermo Scientific, 24620, Liettua) valmistajan ohjeen mukaan ja kuvattiin skannerilla (Canon Image Runner AdvanceE, C52501, Kiina). Näyteproteiinien liikkuvuutta verrattiin proteiinikostandardin (Precision Plus Protein Dual Color, Bio-Rad, 161-0374, USA) proteiineihin kitinaasien molekyylipainon määrittämiseksi.

Kitinaasiaktiivisuus määritettiin 12,5 % (w/v) PAGE:lla, jossa erotusgeeli sisälsi 0,01 % (v/v) glykolikitiiniä. Glykolikitiini, kitiinin liukoinen muoto, oli valmistettu reasetyloimalla glykolikitosaania (Sigma-Aldrich, 67753, Islanti) Trudelin ja Asselinin (1989) menetelmän mukaan. Latauspuskuriin ei lisätty β -merkaptoetanolia eikä SDS:a, eikä näytettä kuumennettu ennen sen lisäystä geelille, mutta geeli ja ajopuskuri sisälsivät SDS:a Laemmliin menetelmän mukaisesti. Geeliä ajettiin jäähauteessa 150 V:n jännitteellä 2,5 h:n ajan,

minkä jälkeen proteiinit renaturoitiin Libantova ym:n (2009) menetelmän mukaisesti keinuttamalla geeliä 4 °C:ssa 1 h 50 mM natriumasetaattipuskurissa pH 5,0, johon oli lisätty 1 % (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T8787, USA) ja 30 min 50 mM natriumasetaattipuskurissa pH 5,0 ilman Tritonia. Tämän jälkeen geeliä käsiteltiin 5 min 0,01 % (w/v) Calcofluor White -liuoksella (Fluka, 18909, Kanada) 500 mM Tris-HCl-puskurissa pH 8,9 ja huuhdeltiin 1 h vesijohtovedellä. Kitinaasiaktiivisuus detektoitiin kuvaamalla glykolikitiinin hajoamisen aikaansaama Calcofluor White -fluoresenssin heikentyminen UV-valossa (Gel Doc XR+ Imaging System, Bio-Rad, USA), jolloin substraatin pilkkoutuminen näkyi geelillä tummina alueina.

4.1.3 Western blot -analyysi

Kationinvaihtokromatografisesti erotettujen kitinaasien koon varmistamiseksi ja tyyppien määrittämiseksi kitinaasit analysoitiin Western blot -menetelmällä. Analyysissa käytettiin kitinaasien detektointiin kolmen eri kitinaasiluokan vasta-aineita.

Kationinvaihtopylvästä eluoitu kitinaasinäyte (E4+E5) ajettiin SDS-PAGE-gradienttigee-lillä kuten aiemmin. Proteiinistandardina oli PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, 26619, Liettua). Geeliä liotettiin ajon jälkeen siirtopuskurissa (25 mM Tris base, 200 mM glysiini, 20 % metanoli) keinuttaen 10 min:n ajan. Geeliltä proteiinit siirrettiin sähköisesti nitroselluloosakalvolle (Amersham Hybond-ECL, 0,45 µm, GE Healthcare, RPN203D, Saksa) kuivablottauslaitteella (Trans-Blot Turbo, Bio-Rad, Singapore) ajoparametrein 2,5 V, 1,0 A ja 30 min. Siirron jälkeen kalvoa pestiin 5 min tTBS-puskurilla (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl ja 0,1 % (w/v) Tween 20). Seuraavaksi sitä käsiteltiin kyllästyspuskurilla (5 % (w/v) rasvatonta maitojauhetta tTBS-puskurissa) keinuttaen 1 h:n ajan huoneenlämmössä, minkä jälkeen kalvoa pestiin jälleen 10 min tTBS-puskurilla. Primäärinen vasta-aine laimennettiin taulukon 2 mukaan 2,5 % (w/v) naudan seerumin albumiinia (bovine serum albumin, BSA) sisältävään TBS-puskuriin (tTBS-puskuri ilman Tween 20:tä), ja kalvoa keinutettiin siinä huoneenlämmössä. Tunnin kuluttua kalvoa pestiin kolmesti 10 min:n ajan tTBS-puskurilla, minkä jälkeen se siirrettiin 1 h:ksi kyllästyspuskuriin 1 : 5 000 laimennettuun sekundääriseen vasta-aineeseen (vuohi anti-kani IgG, HRP-konjugoitu, Agrisera, AS09 602, Ruotsi). Lopuksi kalvoa pestiin

vielä neljästi 10 min:n ajan tTBS-puskurilla. Nitroselluloosakalvo käsiteltiin ECL-reagensseilla (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, RPN2232, Iso-Britannia) tuotteen ohjeen mukaan ja siirrettiin valotusalustalle (Hyper-cassette, Amersham RPN12649, Iso-Britannia). Filmi (Amersham Hyperfilm ECL, 28906835, Iso-Britannia) altistettiin ECL-käsitellylle nitroselluloosakalvolle 15 s:n (I lk:n kitinaasivasta-aine) ja 1 min:n (II ja IV lk:n kitinaasivasta-aine) ajan. Filmi kehitettiin tuotteiden (Carestream Readymatic, Developer & Replenisher, 502 3866, Fixer & Replenisher, 502 3874, Belgia) valmistajan ohjeen mukaan.

Taulukko 2. Primääriset vasta-aineet, niiden toimittajat ja käytetyt laimennokset.

Primäärisen vasta-aineen kohde	Toimittaja	Alkuperä	Laimennos
Luokan I kitinaasi	Agrisera (AS07 207)	Kani	1 : 25 000
Luokan II kitinaasi (<i>Pseudotsuga menziesii</i>)	A. Zamani, Canadian Forest Service	Kani	1 : 500
Luokan IV kitinaasi (<i>Pinus monticola</i>)	A. Zamani, Canadian Forest Service	Kani	1 : 500

4.2 Kitinolyyttisten entsyymien tuotto *Pichia pastoris* -hiivassa

Kuusisolususpensioviljelmästä puhdistettua kitinaasia tuotettiin heterologisesti toisessa isäntäorganismissa, *Pichia pastoris* -hiivassa, koska haluttiin varmistua kitinaasin puhtaudesta. Kitinaasin rinnalla tuotetavaksi otettiin mukaan myös kuusipuussa voimakkaasti ilmenevä kitinaasin kaltainen proteiini.

4.2.1 Komplementaarisen DNA:n (cDNA) kloonauk

Kitinaasi-DNA:ta tuotettiin RNA:sta, monistettiin ja liitettiin DNA-kuljettajana toimivaan plasmidivektoriin yhdistelmä-DNA-plasmidiksi. Vektori siirrettiin *Escherichia coli* -bakteeriin, jossa sitä lisättiin ja josta kitinaasi-DNA-sekvenssin sisältävä plasmidi-DNA eristettiin jatkokäsiteltäväksi sopivaksi *P. pastoris* -hiivaan siirtoon.

Kokonais-RNA oli eristetty, puhdistettu ja pakastettu sekä kuusipuusta että kuusisolususpensioviljelmästä. cDNA-synteesi eli DNA:n kopiointi käänteiskopioijaentsyymillä RNA:sta tehtiin oligo-d(T)_{29VN} -alukkeella SuperScript Reverse Transcriptase -pakkauk-

sen (Invitrogen, 18080-044, USA) ohjeen mukaan. Tuotettu cDNA monistettiin polymeerasiketjureaktiolla (polymerase chain reaction, PCR) lämpökierrätinlaitteella (Eppendorf Master Cycler Gradient, Saksa) käyttäen taulukossa 2 esitettyjä alukkeita ja Phusion-DNA-polymeraasia (Thermo Scientific, F-530S, Liettua) entsyymien ohjeen ja taulukon 3 PCR-reaktioaikojen ja -lämpötilojen mukaan. Alukkeet oli suunniteltu aiemmin kuusisolususpensiosta eristetyn ja proteiinigeeliltä tunnistetun (Meilahti Clinical Proteomics Core Facility, Helsinki) kitinaasin ja kuusigenomisekvenssien ConGenIE-tietokannasta (Nystedt ym. 2013) poimitun, erityisesti kuusipuussa ilmenevän kitinaasin kaltaisen proteiinin MA_726207g0010 sekvenssien mukaan.

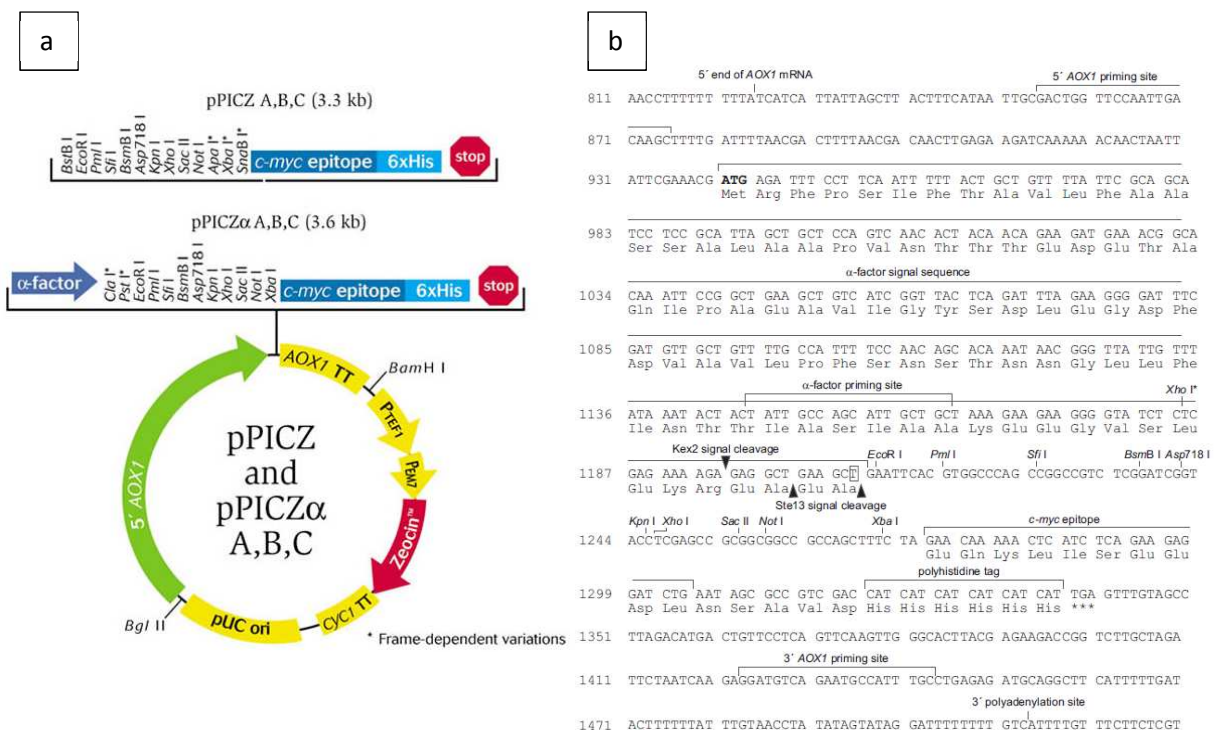
PCR-tuotteet eroteltiin agarosigeelillä (1,5 % (w/v) agarosi (Sigma-Aldrich, A9539, USA) ja 0,01 % (w/v) etidiumbromidi (H5041, Promega, USA) Tris-boraatti-EDTA (TBE)-puskurissa (BP1333-4, Fisher Scientific, Belgia)) agarosigeelielektroforeesilla (AGE) GNA 200 -ajokammiossa (Pharmacia Biotech, Ruotsi), jossa ajopuskurina oli TBE 0,01 % (w/v) etidiumbromidilla terästettynä. Menetelmässä negatiivisesti varautuneet nukleihinahapot kulkeutuvat sähkökentässä positiivista napaa kohti kokonsa mukaan erottuen. Kokostandardina käytettiin λ DNA:ta (Thermo Scientific, SD0011, Liettua) pilkottuna *Pst*I-entsyymillä (Thermo Scientific, FD0614) lisättynä näytepuskuriin (20 % (w/v) Ficoll PM400, 50 mM EDTA pH 8, 0,05 % (w/v) bromofenolisini, 0,1 % (w/v) ksyleenisyanolisini TBE:ssä) pitoisuuteen 0,004 % (w/v). Kitinaasin 864 emäsparin (base pair, bp) ja kitinaasin kaltaisen proteiinin 1 293 bp:n kokoiset DNA-vyöhykkeet eristettiin geeliltä (E.Z.N.A. Gel Extraction Kit, VWR, D2500-02, USA). DNA-jaksot liitettiin pJET1.2/blunt-plasmidivektoriin ja plasmidit siirrettiin *E. coli*n kompetentteihin eli DNA:ta vastaanottamaan kykeneviin DH5 α -soluihin (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific, K1232, Liettua). Bakteerisolot, joissa oli halutun kitinaasi-DNA-jakson sisältänyt plasmidivektori, eristettiin, ja niistä erotettiin ja puhdistettiin plasmidi-DNA (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, 27160, Saksa).

4.2.2 Kitinaasi-DNA:n ja plasmidin muokkaus ja siirto hiivasoluihin

Kitinaasi-DNA:sta poistettiin signaalsekvenssi ja siihen lisättiin restriktioentsyymikohdat vektoriin liittämistä varten sekä polyhistidiinisekvenssi helpottamaan myöhempää puh-

distamista. Kitinaasi-DNA ja plasmidivektori katkaistiin restriktioentsyymeillä ja yhdistettiin toisiinsa, ja plasmidi siirrettiin bakteerisoluihin lisättäväksi ennen sen viemistä *Pichia*-soluihin.

Proteiinituotossa edettiin EasySelect *Pichia* Expression Kit -tuottosysteemin (Invitrogen, 122701, USA) ohjeen mukaan pPICZ α A-vektoria käyttäen (kuva 3). Alukkeet suunniteltiin kitinaasi-DNA-sekvenssien PCR-monistukseen niin, että ne monistivat kohdekittinaasisekvenssit ilman signaalisekvenssiä, koska *Pichia*-tuottosysteemi käytti proteiinien eritykseen omaa *Saccharomyces cerevisiae* -hiivan luontaista erityssignaalia. Kittinaasisekvenssit monistettiin sekä polyhistidiinisekvenssi alukkeeseen 3'-päässä proteiinien myöhempää puhdistusvaihetta ajatellen että ilman sitä. Alukkeiden päihin lisättiin kohdat *KpnI*- ja *XbaI*-restriktioentsyymeille, jotka on merkitty alleviivaten sekvenssiin (taulukko 3). Monistus tapahtui Phusion-DNA-polymeraasilla käyttäen kitinaasi-DNA:n sisältänyttä pJET1.2/blunt-plasmidi-DNA:ta templaattina entsyymien ohjeen ja taulukon 4 PCR-reaktioaikojen ja -lämpötilojen mukaan.



Kuva 3. a) pPICZ α A-vektorin rakenne. b) pPICZ α A-vektorin kloonauskohdat (EasySelect™ *Pichia* Expression Kit, Thermo Fisher Scientific).

Taulukko 3. Käytetyt alukkeet monistettaessa kitinaasi-cDNA:ta ja kitinaasi-DNA:ta liitettäväksi pPICZαA-vektoriin. Restriktioentsyymien tunnistamat kohdat on merkitty alleviivaten sekvensseihin.

	Kuusisolukkoviljelmän kitinaasi	Kuusipuun kitinaasin kaltainen proteiini
cDNA:n monistus	5'-TAATCAGAGTCAGTGGGTAG-3'	5'-ACTCTGATTGTCCACCAAA-3'
Monistus	5'-ATACTTAGCAGCCATGAAC-3'	5'-ACAGATTACGATCCAGGAGA-3'
pPICZαA-vektoriin	5'-CTTAGGTACCGCAGACGAAGATCAGGCG-3'	5'-CTTAGGTACCGCTCAAACTGTGGCTGTG-3'
	5'-CTTATCTAGACTAAGTGGACGCGGAAGAAG-3'	5'-CTTATCTAGATTAGCAGGAGACATTGGC-3'
	5'-CTTATCTAGAACAGTGGACGCGGAAGAAGG-3' (His)	5'-CTTATCTAGAACGCAGGAGACATTGGCTCC-3' (His)
Forward-alukkeet merkitty värillä pohjalla		
Reverse-alukkeet merkitty vihreällä pohjalla		

Taulukko 4. PCR-reaktio-olot heterologisen tuoton eri vaiheissa käytettäessä Eppendorf Master Cycler Gradient -laitteistoa.

Vaihe	Kitinaasi-cDNA:n lisäys				Kitinaasi-DNA pPICZαA-vektoriin			
	Kitinaasi		Kitinaasin kalt. proteiini		Kitinaasi		Kitinaasin kalt. proteiini	
	Lämpötila °C	Aika s	Lämpötila °C	Aika s	Lämpötila °C	Aika s	Lämpötila °C	Aika s
1 Alkudenaturaatio	98	180	98	180	98	30	98	30
2 Denaturaatio	98	10	98	10	98	10	98	10
3 Alukkeiden kiinnitys	55	30	68 (-1/sykli)	30	60/63 (His)	30	64/65,5 (His)	30
4 Pidennys	72	20	72	60	72	60	72	60
5 Syklit (vaiheet 2-4)	29x		9x		15x		15x	
6 Denaturaatio			98	10				
7 Alukkeiden kiinnitys			58	30				
8 Pidennys			72	60				
9 Syklit(vaiheet 6-8)			19x					
10 Loppupidennys	72	600	72	480	72	480	72	480

PCR-tuotteet eroteltiin 1,5 % (w/v) agarosigeelillä kuten edellä, ja 776 (+ 63 His) bp:n (kitinaasi) ja 878 (+ 63 His) bp:n (kitinaasin kaltainen entsyymi) kokoiset vyöhykkeet eristettiin siltä (E.Z.N.A. Gel Extraction Kit). DNA-sekvenssien päät katkaistiin *KpnI*- (Thermo Scientific, FD0524) ja *XhoI*-restriktioentsyymeillä (Thermo Scientific, FD0694), ja DNA puhdistettiin samalla E.Z.N.A.-tuotteella.

pPICZαA-plasmidivektori siirrettiin lämpöshokin avulla kompetentteihin DH5α-soluihin, ja Zeocin-antibiootin (Invitrogen, R25001, Ranska) avulla valituista, plasmidit sisältäneistä bakteerisolusta eristettiin ja puhdistettiin plasmidi-DNA (QIAprep Spin Miniprep Kit). Plasmidi leikattiin *KpnI*- ja *XhoI*-restriktioentsyymeillä, syntynyt lineaarinen tuote eroteltiin 1,5 % (w/v) agarosigeelillä, ja 3,6 kbp:n kokoinen vyöhyke eristettiin siltä (E.Z.N.A. Gel Extraction Kit).

Kitinaasi-DNA-sekvenssin liittäminen pPICZαA-plasmidivektoriin tehtiin käyttäen apuna New England Biolabsin ligaatiolaskinta (<http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>). Sen mukaan vektorin massan ollessa 40 ng kitinaasi-DNA:ta tarvittiin 26 ng, kun tavoitteena 800 bp:n kitinaasi-DNA -jaksolle ja 3 600 bp:n vektorille oli molaarinen kitinaasi-DNA-vektori -suhde 3 : 1. Plasmidin siirtäminen *E. coli*n kompetentteihin DH5α-soluihin tapahtui lämpöshokin avulla *Pichia*-tuottosysteemin ohjeen mukaan. pPICZαA-plasmidit eristettiin bakteerisolusta (QIAprep Spin Miniprep Kit), ja kitinaasi-DNA-sekvenssien sijainti oikeassa lukekehyksessä varmistettiin sekvensoimalla (Haartman-instituutti, Helsinki). Negatiiviseksi kontrolliksi siirrettiin DH5α-soluihin pelkkä plasmidi ilman kitinaasi-DNA:ta.

10 µg pPICZαA-plasmidi -DNA:ta kitinaasi-DNA:n kera sekä ilman linearisoitiin katkaissamalla se *MssI*-restriktioentsyymillä (Thermo Scientific, FD1344) ja puhdistettiin fenolikloroformi -uutolla. *P. pastoris* -linjan X-33 solut tehtiin kompetenteiksi, plasmidi-DNA siirrettiin niihin elektroporaatiolla voimakkaan, lyhytkestoisen sähköpulsin avulla (BioRad GenePulser Xcell, USA, fungal protocol / *P. pastoris*) ja plasmidin sisältäneet hiivasolut valikoitiin tuottosysteemin ohjeen mukaan.

4.2.3 Tuotto

Plasmidit sisältäneitä hiivasoluja viljeltiin kolmen päivän ajan ravistuksessa. Proteiinien tuottumista edistettiin säännöllisin metanolilisäyksin, kunnes alusta kerättiin talteen jatkoanalysoitavaksi.

pPICZαA-plasmidin sisältäviä X-33 -*P. pastoris* -soluja kasvatettiin Buffered Glycerol-complex Medium (BMGY, 25 ml / 250 ml:n erlenmeyer-astia) ja Buffered Methanol-complex Medium (BMMY, 200 ml / 1 000 ml:n erlenmeyer-astia) -alustoilla 270 rpm:n ravistusnopeudella (Kühner Shaker ISF1-W, Sveitsi) 29 °C:ssa 3 vrk *Pichia*-tuottosysteemin ohjeen mukaan. Proteiinien erittyminen kasvatusalustaan indusoitiin metanolilisäyksin 0,5 %:n loppupitoisuuteen 24 h:n välein. Kasvatuksen päätyttyä alusta erotettiin soluista sentrifugoimalla sitä 2 000 g:n painovoimalla (Sorvall Evolution RC, USA) 4 °C:ssa 10 min, ja 200 ml jokaista alustaa kerättiin talteen. Negatiivinen kontrolli kasvatettiin samoin kuin kitinaasi-DNA:ta kantaneen plasmidinkin sisältäneet solut. Koska proteiinia

huomattiin olleen varsinkin His-hännällisten näytteiden tuottoalustoissa vähän, His-hännätöntä kitinaasia tuotettiin 600 ml, His-hännätöntä kitinaasin kaltaista proteiinia 800 ml ja His-hännällistä kitinaasin kaltaista proteiinia 1 000 ml lisää samalla menetelmällä. His-hännällisen kitinaasin tuotosta ja analysoinnista luovuttiin kokonaan, kun His-hännätöntä muotoa kitinaasista havaittiin tuottuvan hyvin runsaasti ja puhdistamisen olevan vaivatonta hännälliseen verrattuna.

4.2.4 SDS-PAGE-, entsyymiaktiivisuus- ja western blot-analyysit

Kasvatusalustanäytteet *P. pastoris* -hiivassa heterologisesti tuotetuista kitinaaseista sekä negatiivisesta kontrollista analysoitiin sekä heti tuoton jälkeen että myös puhdistettuna myöhemmin. Proteiinien kokoa, kitinolyyttistä aktiivisuutta sekä tunnistettavuutta eri kitinaasiluokkien vasta-aineilla tarkasteltiin SDS-PAGE -, aktiivisuusgeeli- ja western blot -menetelmillä kuten luvuissa 4.1.2 ja 4.1.3 on kuvattu (s. 25-27).

Alustanäytteet *P. pastoris* -hiivassa tuotetuista kitinaaseista ja negatiivisesta kontrollista analysoitiin ensin ennen näytteiden puhdistusta alustaa konsentroimatta. I luokan kitinaasivasta-aineen sijaan käytettiin His-tag-kani -vasta-ainetta (Cell Signalling, 2365S) laimennoksena 1 : 2 000 ja filmin altistusaikana kaikille vasta-aineille 30 s. Ammoniumsulfaattisaostuksen ja kromatografisten puhdistusvaiheiden jälkeen hiivassa tuotetut kitinaasit analysoitiin samoin, mutta koska osa analysoitavien proteiinien pitoisuuksista oli pieniä, siirryttiin määrittämään proteiinit SDS-PAGE -geeleiltä hopeavärjäyksellä Blumin menetelmän mukaan (Blum ym. 1987) sillä erotuksella, ettei hopeanitraattiliuokseen lisätty formaldehydiä. Vasta-aineina oli IV lk:n kitinaasivasta-aine sekä His-tag-kani -vasta-aine ja filmin altistusaikana molemmille vasta-aineille 5 s.

Entsyymiaktiivisuustestaus toteutettiin glykolikitiiniä sisältävän PAGE:n lisäksi pisara-analyysina maljalla siten, että 1,5 % agarosigeeliin 100 mM natriumasetaattipuskurissa pH 5,0 lisättiin glykolikitiiniä pitoisuuteen 0,02 % (w/v) petrimaljalla. 5 µl:n näyte pipetoitiin geelin päälle, geeliä inkuboitiin 37 °C:ssa 1 h, ja Calcofluor-käsittely ja kitinaasiaktiivisuuden detektointi tehtiin kuten aiemmin (luku 4.1.2, s. 25-26). Negatiivisena kontrollina toimi pelkkä puskuriliuos. Positiivisena kontrollina käytettiin kuusisolususpensio-

viljelmästä aikaisemmin työn ulkopuolella puhdistettua ja erotettua geelisuodatus-jaetta, jonka aktiivisuuden glykolikitiinille oli todettu olleen voimakasta. Näytteiden kiitiinigeelimaljalle tuottamia reaktioita verrattiin negatiiviseen ja positiiviseen kontrolliin.

4.2.5 Proteiinien puhdistus

P. pastoris -hiivassa tuotetut kitinaasit/kitinaasin kaltaiset proteiinit pyrittiin erottamaan *Pichian* omista proteiineista ja alustakomponenteista. Puhdistus aloitettiin proteiinien ammoniumsulfaattisaostuksella, minkä jälkeen jatkettiin kitinaasien erottamista muista proteiineista geelisuodatus-, affiniteetti- ja kationinvaihtokromatografisesti

Kitinaasin sekä His-hännällisen ja -hännättömän kitinaasin kaltaisen proteiinin tuottoaluston proteiinit ammoniumsulfaattisaostettiin kyllästymisvälille 50–70 % (314 + 135 g/l). Puskuriliuokset vaihdettiin 50 mM natriumasetaattipuskuriin pH 5,0 ja liuokset konsentroitiin Vivaspin Turbo 15 -kolonneilla (Sartorius, VS15T01, 10 kDa, Saksa) 4 000 g:n painovoimalla (Eppendorf Centrifuge, 5180R, Saksa) 4 °C:ssa. His-hännättömän kitinaasin kaltaisen proteiinin näyteproteiinit pyrkivät kasautumaan yhteen ja jäämään liukenematta. Tätä pyrittiin vähentämään käyttämällä pitoisuudeltaan suurempaa 150 mM:n natriumasetaattipuskuria sekä suodattamalla näyte huokoskooltaan 0,45 µm:n polyeeterisulfonikalvon (VWR, 514-0075, USA) läpi.

Kitinaasit ja kitinaasien kaltaiset proteiinit jatkopuhdistettiin kokolajittelemalla ne geelisuodatuskromatografisesti Hiload 16/60 Superdex 75 Prepgrade -pylväällä (Pharmacia Biotech, 17-1068-01, Ruotsi) ÄKTAprime -nestekromatografilla. Geelisuodatusmenetelmän kokoerotteluvaikutus perustuu suurempien partikkelien etenemiseen pylväässä pienempiä nopeammin. Ajo tapahtui 50/150 mM natriumasetaattipuskurissa pH 5,0 virtausnopeudella 0,8 ml/min 2 ml:n näytejakeita keräten, kunnes proteiinit olivat huuhtoutuneet pylväästä ja A₂₈₀-arvo oli palautunut lähelle nollaa. Kromatogrammeihin muodostui kaksi huippua, joita vastaavat näytteet analysoitiin hopeavärjättyillä SDS-PAGE -geeleillä. Tavoiteltua näytekokoa vastaavat jakeet yhdistettiin ja konsentroitiin kuten aiemmin.

His-hännällisen kitinaasin kaltaisen proteiinin geelisuodatuksen perusteella valitut jakeet vaihdettiin LEW-puskuriin (PrepEase His-tag Purification Midi Kit, PN78733 1 KT, Saksa) PD-10-pylväillä, ja näyte puhdistettiin metalli-oniaffiniteettikromatografisesti tuotteen ohjeen mukaan. Menetelmässä nikkeli-ioneilla varattu, kelatoivia TED (tris-karboksimetyylietyleenidiamiini) -ryhmiä sisältävä resiini sitoo histidiiniä sen rakenteen imidatsolirenkaasta, ja His-hännällinen proteiini voidaan vapauttaa lisäämällä imidatsolia sisältävää eluutiopuskuria kilpailemaan resiinin sitoutumispaikoista. Puskuri vaihdettiin 50 mM natriumasetaattipuskuriksi pH 5,0 imidatsolin poistamiseksi näytteistä ja näyte konsentroitiin kuten ammoniumsulfaattisaostuksen jälkeen (= E8). His-hännättömän kitinaasinäytteen geelisuodatuksessa valitut jakeet jatkopuhdistettiin affiniteettikromatografisesti kitiinihelimipylväällä (= E6) sekä kationinvaihtokromatografialla (= E7) kuten on kuvattu luvussa 4.1.1 (s. 23-25). His-hännätöntä kitinaasin kaltaista proteiinia yritettiin geelisuodatuksen jälkeen puhdistaa myös kitiinihelimipylväällä sekä kationinvaihtokromatografialla, mutta näytteestä ei saatu mitään erotettua, joten jatkoanalyysit tehtiin geelisuodatuksesta valituista myös paljon muita proteiineja sisältäneistä jakeista (= E9).

4.2.6 Deglykosylaatio

Näytteet käsiteltiin glykosylaation eli hiilihydraattiosan proteiinista katkaisevalla entsyymillä mahdollisten glykosylaatioiden havaitsemiseksi proteiineissa, koska ylimääräiset glykosylaatiot voivat vaikuttaa proteiinien toimintaan. Tämän jälkeen käsittelemättömiä näytteitä verrattiin käsiteltyihin.

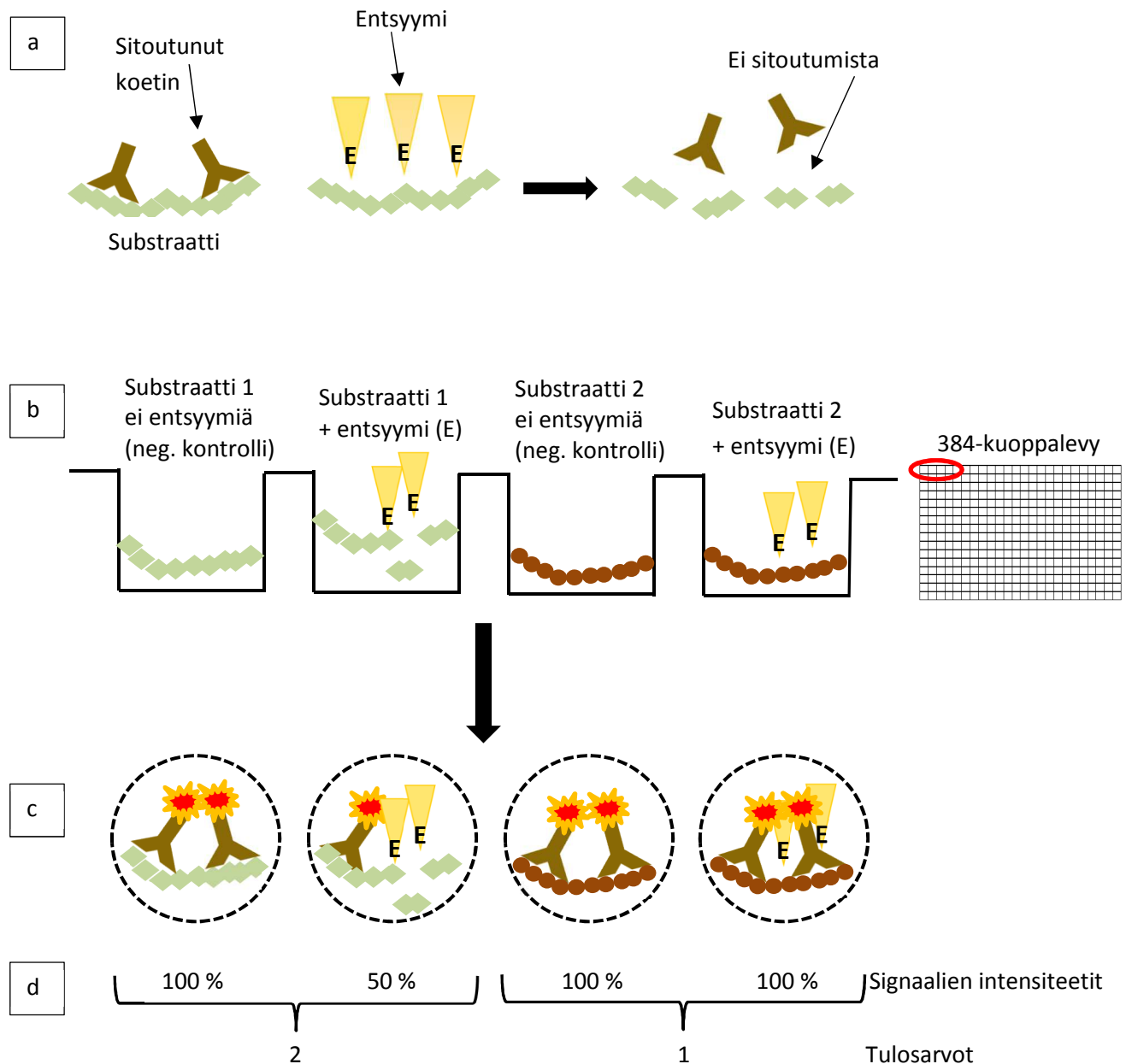
P. pastoris -hiivassa tuotetuille näytteille E7, E8 ja E9 sekä kuusen soluviljelyalustasta eristetyille E4- ja E5-näytteille tehtiin glykosylaatioiden poisto käsittelemällä ne PNGase F -entsyymillä, joka erottaa oligosakkaridin proteiinista katkaisemalla sen sisimmän *N*-asetyyllukosamiinin ja proteiinin asparagiinin välistä silloin, kun *N*-asetyyllukosamiini ei ole lisäksi kytkeytynyt α -(1 \rightarrow 3)-fukoosiin. Deglykosylaatio tehtiin PNGase F -tuotteen (New England BioLabs, P0704S, USA) denaturoivan ohjeen mukaan. Sen jälkeen puskuri vaihdettiin 50 mM natriumasetaattipuskuriksi pH 5,0 ja näytteet konsentroitiin ja analysoitiin SDS-PAGE- sekä aktiivisuusgeeleillä kuten aiemmin luvussa 4.1.2 (s. 25-26).

4.3 Hiilihydraattimikrokalvoanalyysi (Carbohydrate microarray)

Kuusisolususpensioviljelmän alustan entsyymit, kitinaasipuhdistusvaiheiden välituotteita sekä alustoista eristetyt ja puhdistetut kitinolyyttiset entsyymit analysoitiin hiilihydraattimikrokalvoanalyysillä. Menetelmä testasi useilla polysakkaridivasta-aineilla, toimivatko entsyymit jollakin kuusiperäisellä substraatilla.

Puolikvantitatiivinen hiilihydraattimikrokalvomenetelmä (kuva 4) hyödyntää robotin näytteenkäsittelytehokkuutta sekä monoklonaalisten vasta-aineitten (monoclonal antibody, mAb) ja hiilihydraattien sitoutumisyksiköiden (carbohydrate binding module, CBM) spesifisyyttä (Moller ym. 2007). Sen avulla voidaan esimerkiksi systemaattisesti tunnistaa kasvisoluseinän glykaaneja tai määrittää erilaisten entsyymien aktiivisuutta eri soluseinäkomponentteihin (Vidal-Melgosa ym. 2015). CoMPP (comprehensive microarray polymer profiling) -menetelmällä solukoiden glykaanit uutetaan vaiheittain pektiini-, hemiselluloosa- ja selluloosarakenteiden erottamiseksi ja näytteet siirretään robotiavusteisesti mikrokalvoille, joilta ne tunnistetaan tai entsyymireaktio määritetään mAb- ja CBM-koettimilla.

Yhdeksän kuusisolususpensioviljelmän tai *Pichia*-tuoton entsyymiä/entsyymiseosta testattiin neljällä kuusiperäisellä substraatilla. Substraatteina käytettiin A3/85-kuusisoluviljelmän kuusisoluja, kuusen kehittyvää ja kypsää puuta sekä A3/85-kuusisoluviljelmään vapautunutta ligniiniä. Hiilihydraattimikrokalvoanalyysi tehtiin kolmessa osassa saman toimintatavan mukaisesti käyttäen joka kerralla samoja substraatteja mutta eri entsyymejä (taulukot 5 ja 6).



Kuva 4. Hiilihydraattimikrokalvoanalyysitekniikan vaiheet. a) Menetelmä perustuu tietyn monoklonaalisen vasta-aineen (mAb) tai hiilihydraatin sitoutumisyksikön (CBM) sitoutumiseen polysakkaridisubstraattipinnan epitooppiin, mikä estyy, jos entsyymi hajottaa tai muuntaa substraattia. b) Substraatit ja entsyymit sekoitetaan kuoppalevyn kaivoissa, ja joka reaktiolle valmistetaan vastaava entsyymitön negatiivinen kontrolli. c) Kuoppalevyjen näyteseokset annostellaan robottiauvusteisesti nitroselluloosakalvolle, jotka käsitellään mAb/CBM-koettimilla. Koettimien sitoutuminen todetaan entsyymiin kytketyillä sekundaarivasta-aineilla, joihin on sidottu värillisen yhdisteen tuottava substraatti. d) Jokaisen reaktion ja negatiivisen kontrollin signaalien väri-intensiteetit määritetään, ja lopulliset tulosarvot saadaan jakamalla negatiivisten kontrollien signaali-intensiteettiä reaktioiden signaali-intensiteetillä (Vidal-Melgosa ym:n (2015) kaavion mukaan).

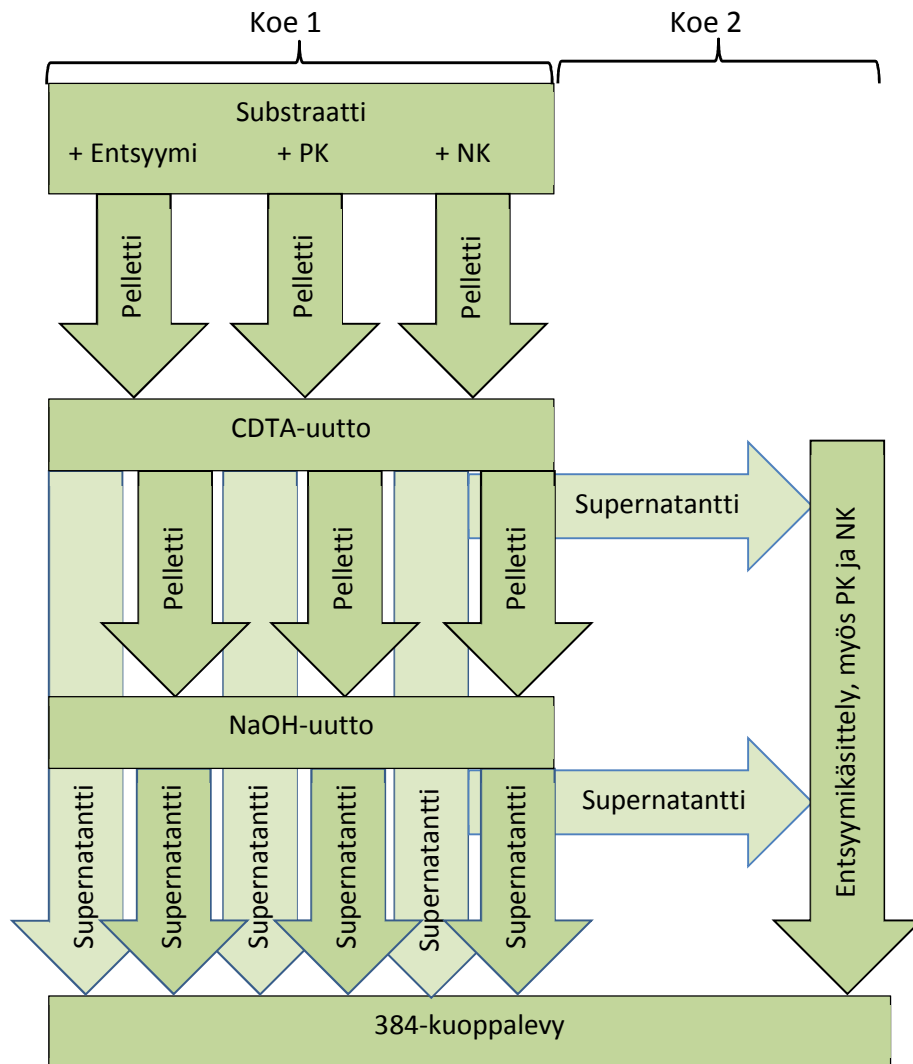
Taulukko 5. Kolmessa hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä käytetyt entsyymit ja niiden pitoisuudet. KKP = kitinaasin kaltainen proteiini.

			Koe 1		Koe 2	
Analyysi 1	Koodi	Proteiini-pitoisuus µg/ml	Entsyymi µl	Puskuri µl	Entsyymi µl	Puskuri µl
Kuusisolususpensioviljelyalusta	E1	2000	150	-	10	10
<i>Streptomyces griseus</i> -kitinaasi (Sigma)	PK	100	150	-	10	10
Analyysi 2 Kuusisolususpensiosta puhdistetut entsyymit	Koodi	Proteiini-pitoisuus µg/ml	Entsyymi µl	Puskuri µl	Entsyymi µl	Puskuri µl
Kitiinipylväaseen sitoutumattomat proteiinit	E2	2760	75	75	10	10
Kitiinipylvään eluaatti	E3	1011	75	75	10	10
Ioninvaihtokromatografisesti puhd. kitinaasi K1	E4	61	37,5	75	10	10
Ioninvaihtokromatografisesti puhd. kitinaasi K3	E5	221	37,5		10	10
<i>Streptomyces griseus</i> -kitinaasi (Sigma)	PK	170	150	-	10	10
Analyysi 3 <i>P. pastoriksessa</i> tuotetut entsyymit	Koodi	Proteiini-pitoisuus µg/ml	Entsyymi µl	Puskuri µl	Entsyymi µl	Puskuri µl
Kitiinipylvään kitinaasieluaatti	E6	7,5	50	50	10	10
Ioninvaihtokromatografisesti puhd. kitinaasi	E7	246	50	50	2,5	17,5
Affiniteettikromatografisesti puhdistettu KKP	E8	81	10	90	2	18
Geelisuodatuksella erotettu KKP (+ muita prot.)	E9	328	50	50	10	10
<i>Streptomyces griseus</i> -kitinaasi (Sigma)	PK	165	100	-	20	-

Taulukko 6. Hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä käytetyt substraattit.

Substraatti	Koodi
A3/85-suspensioviljelmän kuusisolot, pakastettu ja kylmäkuivattu	S1
Kehittyvä kuusipuu, jauhettu ja kuivattu	S2
Kypsä kuusipuu, jauhettu ja kuivattu	S3
A3/85-kuusisolususpensioviljelmään vapautunut ligniini, uutettu 1 M NaCl:lla, kuivattu ja pakastettu	S4

Substraattit käsiteltiin ensin pektiinirakenteita uuttavalla sykloheksaani-1,2-diamiinitetraetikkahapolla (CDTA) ja sen jälkeen hemiselluloosarakenteita uuttavalla natriumhydroksidilla (NaOH). Jokaisella analyysikerralla kaksi peräkkäistä mikrokalvokoetta oli suunniteltu niin, että substraatin entsyymikäsittely tehtiin sekä ennen substraatin uuttoa (koe 1) että vasta niiden jälkeen (koe 2) (kuva 5).



Kuva 5. Kuoppalevyllä jaettujen näytteen käsittelyvaiheet. Kokeessa 1 entsyymi lisättiin substraatile ennen uuttoja, positiivisena kontrollina (PK) substraatile lisättiin kaupallista kitinaasia ja negatiivisena kontrollina (NK) puskuriliuosta. CDTA-uuton jälkeen pelletti siirtyi NaOH-uuttoon ja molempien uuttojen jälkeen supernatantit analysoitiin kuoppalevyllä. Kokeessa 2 entsyymi (myös positiivinen ja negatiivinen kontrolli) lisättiin substraatile vasta uuttojen jälkeen kuoppalevyllä. Silloin substraattina toimi kokeen 1 negatiivisen kontrollin eli substraatti-puskuri -seoksen uuton jälkeinen supernatantti.

4.3.1 Entsyymien lisäys ennen uuttoja (Koe 1)

Substraattien käsittely

Entsyymit E1-E9 (taulukko 5), 100 mM natriumasetaattipuskuri pH 5,0 negatiivisena kontrollina (NK) tai kaupallinen *Streptomyces griseus* -bakteerin kitinaasi (Sigma, C6137) 100 mM natriumasetaattipuskurissa pH 5,0 positiivisena kontrollina (PK) lisättiin 10 mg:lle substraatteja S1–S4 (taulukko 6) kahtena kerranteena laimennettuna 50 mM nat-

riumasetaattipuskuriin pH 5,0 taulukossa 5 esitettyjen määrien mukaisesti. Näytteet homogenisoitiin ravistamalla niitä kierrosnopeudella 360 rpm (Tissue Lyser II, Retsch, Qiagen) metallikuulan kanssa huoneenlämmössä 2 h. Putkia sentrifugoitiin 2 762 g:n painovoimalla huoneenlämmössä 10 min, minkä jälkeen pelletit erotettiin CDTA-uuttoon.

CDTA-uutto pektiinien erottamista varten

30-kertainen tilavuus 50 mM CDTA:ta (Fluka, 34588) pH 7,5 lisättiin näytepelleteille. Näytteitä ravistettiin huoneenlämmössä ensin 1 620 rpm:n kierrosnopeudella (Tissue Lyser II, Retsch, Qiagen) 2 min ja sen jälkeen 360 rpm:n kierrosnopeudella 2 h. Putkia sentrifugoitiin 2 762 g:n painovoimalla huoneenlämmössä 10 min, minkä jälkeen supernatantit siirtyivät analysoitavaksi kuoppalevyille ja pelletit NaOH-uuttovaiheeseen.

NaOH-uutto hemiselluloosa-ainesten erottamista varten

30-kertainen tilavuus 4 mM natriumhydroksidia, johon oli lisätty 0,1 % natriumborohydridiä (NaBH_4), lisättiin pelleteille CDTA-uuton jälkeen. Näytteitä ravistettiin ja sentrifugoitiin kuten CDTA-uuttovaiheessa, pelletit hylättiin ja supernatantit siirrettiin jatkoanalysoitaviksi. NaOH-uuton jälkeen näytteiden pH säädettiin 5,5:een 100 % etikkahapolla ennen niiden pipetointia 384-kuoppalevyille.

Pipetointi kuoppalevyille

25 µl supernatanttia ja 25 µl ArrayJet-puskuria pipetoitiin kaivoihin 384-kuoppalevyille (Greiner BioOne, 781280). Näytteistä tehtiin levyille ArrayJet-puskuriin kaksi (2. analyysi, koe 2), kolme (3. analyysi) tai neljä (1. ja 2. analyysi, koe 1) lopputilavuudeltaan 40 µl:n laimennosta, 1 : 2, 1 : 10, 1 : 50 ja 1 : 250 kahtena kerranteena.

4.3.2 Entsyymien lisäys uuttojen jälkeen (Koe 2)

Osa negatiivisen kontrollin (puskuri + substraatti) supernatanteista ensimmäisen kokeen CDTA- sekä NaOH-uuttojen jälkeen käytettiin toisen kokeen entsyymikäsittelyyn. 12,5 µl negatiivisen kontrollin supernatanttia ja 12,5 µl ArrayJet-puskuria pipetoitiin kaivoihin 384-kuoppalevyille. Näytteistä tehtiin levyille laimennokset ja kerranteet kuten kokeessa 1. 20 µl:n substraattilaimennussarjat käsiteltiin entsyymillä, positiivisena kontrollina

toimineella kaupallisella kitinaasilla tai negatiivisena kontrollina toimineella 100 mM natriumasetaattipuskurilla pH 5,0 taulukossa 5 esitettyjen määrien mukaisesti.

4.3.3 Entsyymien sisältämät polysakkaridit ja testaus ilman uuttoja

Entsyymien itsensä mahdollisesti sisältämien polysakkaridien havaitsemiseksi kuoppalevyille lisättiin toisella ja kolmannella analyysikerralla pelkästään entsyymiin (20 µl) ja puskurin (20 µl) käsittävät näytteet ilman substraattia tai uuttoa. Kolmannella analyysikerralla kuoppalevyillä analysoitiin myös entsyymi-substraatti -reaktio ilman substraatin uuttamista ja verrattiin mahdollisia eroja uuttokäsittelyihin substraatteihin.

4.3.4 Näytteiden siirto kalvoille ja vasta-ainekäsittelyt

Kuoppalevyiltä entsyymikäsitellyt substraattinäytteet siirrettiin nitroselluloosakalvoille robottiaivusteisesti. Kalvot käsiteltiin lähes kolmellakymmenellä eri vasta-aineella / hiilihydraattiin sitoutuvalla yksiköllä entsyymien mahdollisen substraattia hajottaneen vaikutuksen havaitsemiseksi.

Kuoppalevyjä keinutettiin ravistajassa 100 rpm:n kierrosnopeudella ensin huoneenlämmössä 2 h ja sen jälkeen 80 °C:ssa 15 min entsyymien inaktivoimiseksi, minkä jälkeen levyjä sentrifugoitiin 2 762 g:n painovoimalla huoneenlämmössä 10 min. Sprint Inkjet Arrayer -laitteen (ArrayJet, Iso-Britannia) JetSpyder-annostelija jakoi näytteet nitroselluloosakalvoille (huokoskoko 0,45 µm, Whatman, Iso-Britannia) 22 °C:n lämpötilassa ja 55 %:n suhteellisessa kosteudessa. Jokaisesta kaivosta tulostui neljä teknistä kerrannetta. Nitroselluloosakalvopalat siirrettiin 6-kuoppalevyille ja kyllästettiin 5 % (w/v) rasvatto-malla maitojauheella fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (PBS, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,5) 85 rpm:n kierrosnopeudella ravistajassa (Heidolf Unimax, Saksa) huoneenlämmössä 1 h:n ajan. Primääriset monoklonaliset vasta-aineet ja hiilihydraattien sitoutumisyksiköt (PlantProbes, Iso-Britannia; Institut National de la Recherche Agronomique, Ranska; BioSupplies, Australia; NZYTEch, Portugali) laimennettiin kyllästyspuskuriin taulukon 7 mukaan, ja liuokset (1,5 ml) lisättiin kalvoille, joita keinutettiin 85 rpm:n kierrosnopeudella ravistajassa huoneenlämmössä 2 h:n ajan. Kalvot pestiin kahdesti PBS:llä, minkä jälkeen niitä keinutettiin

PBS:ssä 85 rpm:n kierrosnopeudella ravistajassa huoneenlämmössä 10 min. Anti-His-tag -hiiri- ja -rotta -sekundäärivasta-aineet sidottuna alkaliseen fosfataasiin (Sigma-Aldrich) laimennettiin kyllästyspuskuriin taulukon 7 mukaan, ja kalvoja keikutettiin liuoksissa 85 rpm:n kierrosnopeudella ravistajassa huoneenlämmössä 2 h:n ajan.

Taulukko 7. Mikrokalvoanalyysien vasta-aineet (va) ja laimennokset.

Primääriset vasta-aineet				Laimennos		Analyysi		
Polysakkaridi	Koodi	Epitoppi	Alku-perä	Prim. va	Sek. va	1	2	3
Glukaani (kalloosi)	BS-400-2	(1→3)-β-D-glukaani	Hiiri	1:1000	1:5000	x	x	x
Glukaani	BS-400-3	(1→3)(1→4)-β-D-glukaani	Hiiri	1:1000	1:5000		x	x
Mannaani	BS-400-4	(1→4)-β-D-mannaani	Hiiri	1:1000	1:5000		x	x
Selluloosa	CMB3-a	(1→4)-β-glukaani	His	1:400	1:1500	x	x	x
RGI:een liittyvä	INRA-RU1	Ramnogalakturnaani I:n runko	Hiiri	1:10	1:5000		x	x
RGI:een liittyvä	INRA-RU2	Ramnogalakturnaani I:n runko	Hiiri	1:10	1:5000		x	x
Pektiini	JIM5	Homogalakturnaani, alhainen esteröitymisaste	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
Pektiini	JIM7	Homogalakturnaani, korkea esteröitymisaste	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
AGP	JIM8	Arabinogalaktaaniproteiini	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
AGP	JIM13	Arabinogalaktaaniproteiini	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
Ekstensiini	JIM20	Ekstensiini	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
Ekstensiini	LM1	Ekstensiini	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
AGP	LM2	Arabinogalaktaaniproteiini (β-sidoksella kiinnittynyt glukuronihappo)	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
RGI:een liittyvä	LM5	(1→4)-β-D-galaktaani	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
RGI:een liittyvä	LM6	(1→5)-α-L-arabinaani	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
Pektiini	LM7	Homogalakturnaani, kohtalainen esteröitymisaste, metyyliyksiköt eivät järjestäytyneet	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
Pektiini	LM8	Ksylogalakturnaani	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
Ksylaani	LM10	(1→4)-β-D-ksylaani	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
Ksylaani	LM11	(1→4)-β-D-ksylaani/arabinokksylaani	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
RGI:een liittyvä	LM12	Ferulaatti (missä tahansa polymeerissä)	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
RGI:een liittyvä	LM13	Lineaarinen (1→5)-α-L-arabinaani	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
Ksyloglukaani	LM15	Ksyloglukaani (XXXG-rakenne)	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
RGI:een liittyvä	LM16	Prosessoitu (1→5)-α-L-arabinaani	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
Pektiini	LM18	Osittain metyyliesteröitynyt homogalakturnaani	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
Pektiini	LM19	Osittain metyyliesteröitynyt homogalakturnaani	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
Pektiini	LM20	Osittain metyyliesteröitynyt homogalakturnaani	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
Mannaani	LM21	(1→4)-β-D-mannaani/galakto-mannaani/glukomannaani	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
Mannaani	LM22	(1→4)-β-D-mannaani/glukomannaani	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
Ksylaani	LM23	(1→4)-β-D-ksylaani	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
Ksyloglukaani	LM24	Ksyloglukaani	Rotta	1:10	1:1000	x	x	x
Ksyloglukaani	LM25	Ksyloglukaani	Rotta	1:10	1:1000	x		x

4.3.5 Tunnistus ja analysointi

Vasta-aineiden / hiilihydraattien sitoutumisyksiköiden aiheuttamat mahdollisten värireaktioiden intensiteetit nitroselluloosakalvoilla muunnettiin analysointiohjelman avulla numeeriseen muotoon. Tulokset määritettiin suhteuttamalla näytteiden arvot negatiivisten kontrollien arvoihin (kuva 4).

Kalvoja huuhdeltiin kahdesti vedellä 2 min:n ajan, minkä jälkeen ne siirrettiin kehitysluokseen (7,5 % (v/v) 5-bromo-4-kloro-3-indolyylifosfaatti BCIP (Thermo Scientific, 34040) ja 6,6 % (v/v) nitro blue tetrazolium NBT (Thermo Scientific, 34045) alkalisen fosfataasin puskuriliuksessa (100 mM dietanoliamiini, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5)). 2–10 min:n altistusajan jälkeen näkyviin tullut reaktio pysäytettiin vedellä. Kalvot kuivattiin yön yli suodatinpaperien välissä, kuvat niistä siirrettiin 2 400 dpi:n tarkkuudella tietokoneelle (CanoScan 8800F, Canon, Tanska), muunnettiin TIFF-muotoon ja signaalit muunnettiin numeerisiksi Array Pro-Analyzer 6.3 -ohjelman (Media Cybernetics, USA) avulla. Keskimääräinen maksimipistesignaali asetettiin 100:ksi ja kaikki muut arvot normalisoitiin sen mukaan. Viittä pienemmät arvot muunnettiin arvoksi viisi. Negatiivisten kontrollien (pelkät puskuriliuokset) signaaliarvot jaettiin näytteiden (entsyymit) signaaliarvoilla, ja tulokset esitettiin lukuarvokarttoina, joissa arvoa 1 suuremmat puskuri/näyte -suhteet viittasivat substraattien pilkkoutumiseen maksimiarvon ollessa 20.

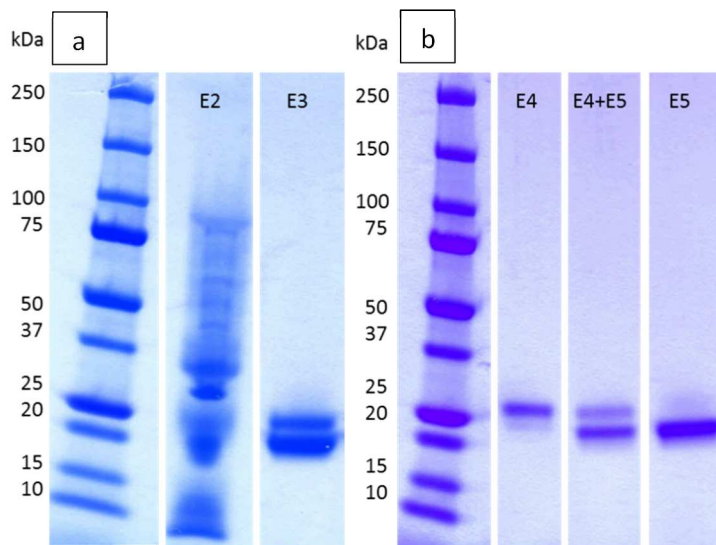
5 Tulokset

5.1 Kuusisolususpensioviljelmän alustasta eristetyt kitinaasit

Kuusen solukkoviljelyalustan proteiineja ja kitinaaseja tarkasteltiin kromatografisten puhdistusvaiheiden jälkeen SDS-PAGE-, kitinaasiaktiivisuus- ja western blot -analyysien avulla. Alustasta erottui voimakkaimmin kaksi kitinolyyttisesti aktiivista pientä I tai IV luokan kitinaasia.

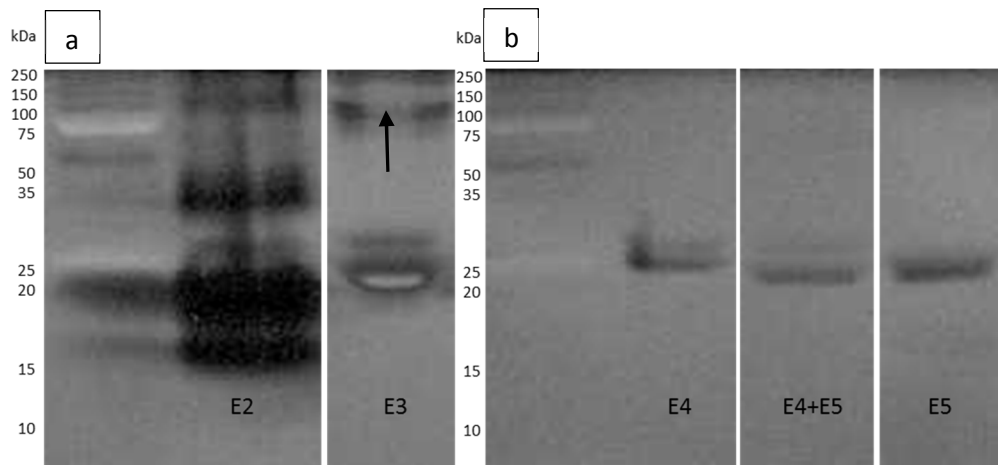
Kitiinipylvääseen kiinnittymättömässä aineksessa (E2) näkyy SDS-PAGE -geelillä odotetusti suuri osa kuusen soluviljelyalustan proteiineista (kuva 5a). Kitiinipylvään eluaatti

(E3) sisälsi kaksi pylvään sitomaa proteiinia, kooltaan noin 25 ja 30 kDa, jotka saatiin kationinvaihtokromatografisesti lähes erotettua toisistaan (E4 ja E5) (kuva 5b).



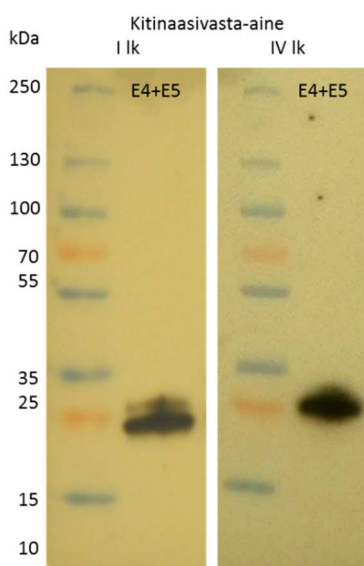
Kuva 5. Kuusen soluviljelyalustasta puhdistetut kitinaasit Coomassie-värjättyllä SDS-PAGE -geelillä. a) Kitiinipylvääseen kiinnittymättömät alustaproteiinit (E2) ja kaksi pylvääseen sitoutunutta kitinaasia (E3). b) Kitiinihelmipylväästä eluoidut, kationinvaihtokromatografisesti erotetut kitinaasit (E4 ja E5).

Kun samat näytteet analysoitiin glykolikitiiniä sisältäneellä aktiivisuusgeelillä, havaittiin sekä kitiinipylväällä puhdistettujen (E3) että edelleen kationinvaihdolla erotettujen (E4 ja E5) proteiinien pilkkovan glykolikitiiniä (kuva 6). Viljelyalustan proteiineissa (E2) oli lisäksi muita puhdistettuja kitinaaseja kooltaan pienempiä sekä suurempia glykolikitiinille aktiivisuutta osoittavia entsyymejä (kuva 6a). Kitiinipylvään eluaatti (E3) sisälsi myös suurikokoisia kitinolyyttisesti aktiivisia proteiineja (kuva 6a), jotka eivät näkyneet Coomassie-värjättyllä SDS-PAGE -geelillä (kuva 5a) ja erottuivat ioninvaihtokromatografiassa pois (kuva 6b).



Kuva 6. Kuusen soluviljelyalustasta puhdistetut kitinaasit Calcofluor White -käsitellyllä glykolikitiinigeelillä. Substraatin pilkkoutuminen näkyy geelillä tummina alueina, ja 25 kDa:n ja 75 kDa:n proteiinistandardit erottuvat kuvissa vaaleina juovina. a) Kitiinipylvään ohittaneissa kuusisolukoviljelmän alustan proteiineissa (E2) on paljon monenkokoisia glykolikitiinille aktiivisia entsyymejä. Pylvääseen tarttui kahden 25 ja 30 kDa:n kitinaasin lisäksi myös molekyylipainoltaan suuria kitinolyyttisiä entsyymejä (E3 ↑). b) Molemmat kitiinihelmipylväällä ja edelleen kationinvaihtokromatografisesti erotetut kuusisoluviljelyalustan kitinaasit osoittivat aktiivisuutta glykolikitiinille (E4 ja E5).

Affiniteetti- ja kationinvaihtokromatografisesti kuusisoluviljelyalustasta puhdistettujen kitinaasien E4 ja E5 seoksesta kitinaasiluokkien I ja IV kitinaasivasta-aineet tunnistivat kaksi entsyymiä, jotka vastasivat aiemmin SDS-PAGE -analyysillä samoista näytteistä erotettuja proteiineja ollen kooltaan noin 25 ja 30 kDa (kuva 7). Sen sijaan kitinaasivasta-aine luokan II kitinaaseille ei tunnistanut näytteestä kitinaaseja.

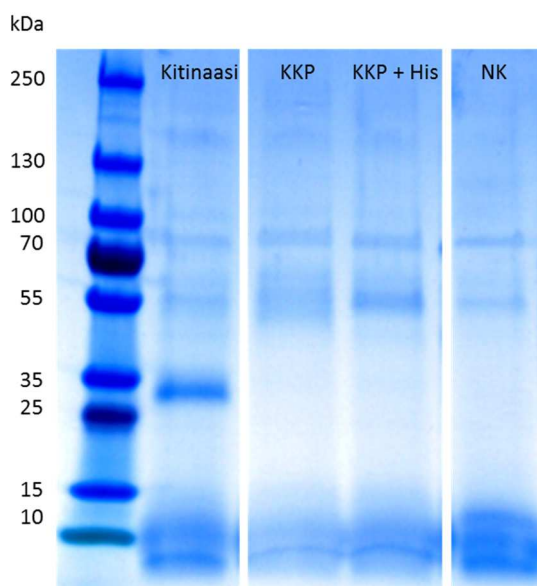


Kuva 7. Western blot -analyysissä kitinaasivasta-aineiden tunnistamat kuusisoluviljelyalustan kitinaasit. Vasta-aineet kitinaasiluokille I ja IV tunnistivat alustasta eristettyjä kitinaaseja.

5.2 *Pichia pastoris* -hiivassa tuotetut kitinolyyttiset entsyymit

Pichiassa tuotettujen kitinaasien ja kitinaasien kaltaisten entsyymien tuottoalustat analysoitiin karkeasti ilman konsentrointia tai jatkopuhdistusta heti tuoton jälkeen tuoton onnistumisen toteamiseksi ja jatkopuhdistusmenetelmän valitsemiseksi. Näytteitä verrattiin negatiiviseen kontrolliin SDS-PAGE- ja aktiivisuusgeeleillä, ja kitinaasit/kitinaasien kaltaiset proteiinit tunnistettiin western blot -analyysillä. Kitinaasi erottui selkeästi, mutta kitinaasin kaltaisten proteiinien käyttäytyminen vaihteli.

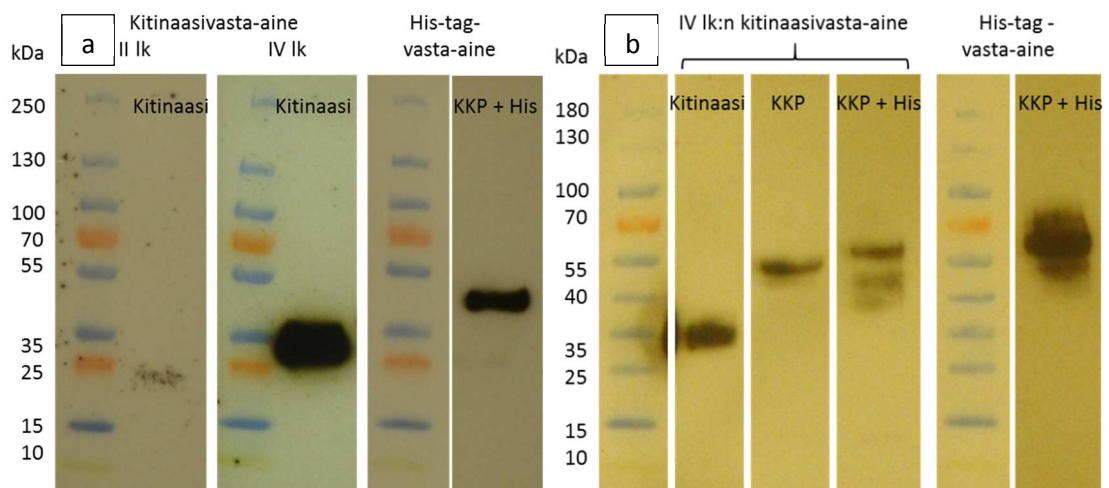
P. pastoris -hiivassa tuotetun kitinaasin tuottoalusta poikkesi negatiivisesta kontrollista (NK, hiivaan siirretty plasmidi ilman kitinaasi-DNA-sekvenssiä) selkeämmin kuin kitinaasin kaltaisten proteiinien tuottoalustat (kuva 8). Voimakkaimmin kitinaasinäytteessä erottui vahva, noin 32 kDa:n kokoinen proteiinivyöhyke, jota ei näy negatiivisessa kontrollissa lainkaan. Kitinaasin kaltaisten proteiinien tuottoalustoissa ei Coomassie-värijätyllä SDS-PAGE -geelillä havaittu juurikaan eroja negatiiviseen kontrolliin verrattuna; vain 55 kDa:n kohdalla ollut proteiinivyöhyke oli hieman leveämpi (kuva 8). Glykolikitiniä sisältäneellä PAGE-geelillä ei todettu aktiivisuutta millään *Pichiassa* tuotetulla näytteellä, kun näytteitä ei ollut konsentroitua eikä alustaa vaihdettu mahdollisten *Pichian* omien kitinaasi-aktiivisuuden estäjien poistamiseksi.



Kuva 8. *Pichian* tuottoalustaan erittyneet proteiinit analysoitiin Coomassie-värijätyllä SDS-PAGE -geelillä. KKP = kitinaasin kaltainen proteiini, NK = negatiivinen kontrolli.

Ensimmäisessä western blot -analyysissä pienemmästä kasvatuserästä (kuva 9a) *P. pastoris* -hiivassa tuotettu kitinaasi tunnistui kaikilla vasta-aineilla. IV luokan kitinaasivasta-aine tuotti His-hännättömästä kitinaasinäytteestä kalvolle reaktion samalle noin 32 kDa:n kohdalle (kuva 9a), jossa vahvin proteiinivyöhyke kitinaasinäytteessä näkyi SDS-PAGE -geelillä (kuva 8). Sen sijaan II luokan kitinaasivasta-aine tunnisti kitinaasinäytteestä heikomman ja pienemmän, noin 22 kDa:n kokoisen vyöhykkeen (kuva 9a). Kitinaasin kaltainen proteiini ilman His-häntää ei tullut näkyviin millään vasta-aineella. His-hännällinen kitinaasin kaltainen proteiini tuli odotetusti esiin His-tag -vasta-aineella (kuva 9a). Vyöhyke oli noin 45 kDa:n kokoinen eikä erottunut lainkaan SDS-PAGE -geelillä (kuva 8).

Toisessa Western blot -analyysissä suuremmasta tuottoerästä (kuva 9b) IV luokan kitinaasivasta-aine tunnisti kitinaasin lisäksi myös sekä His-hännällisen että -hännättömän kitinaasin kaltaisen proteiinin. Tosin His-hännällinen proteiini näytti jakaantuneen kolmeksi vyöhykkeeksi, joista pienin oli samankokoinen kuin ensimmäisessä tuottoerässä His-tag -vasta-aineella detektoitunut, mutta voimakkain noin 62 kDa. Myös His-tag -vasta-aine detektoi His-hännällisen kitinaasin kaltaisen proteiinin kolmena vastaavan kokoisena proteiinivyöhykkeenä.

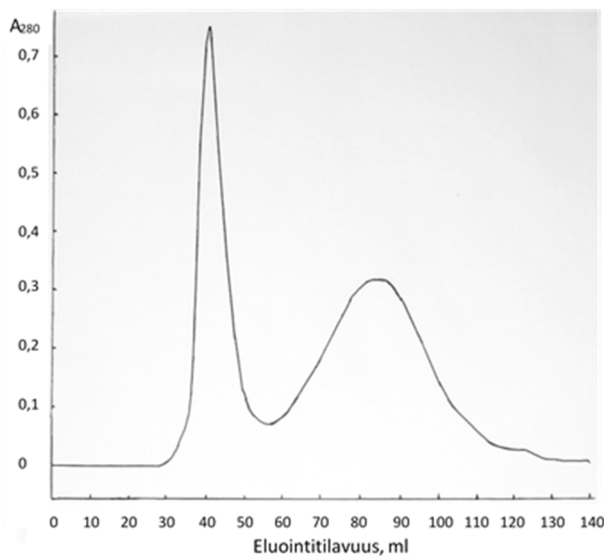


Kuva 9. Western blot -analyysissä kitinaasivasta-aineiden tunnistamat *Pichia* tuottoalustaan erittyneet kitinaasit / kitinaasin kaltaiset proteiinit ensimmäisessä pienemmässä tuottoerässä (a) ja toisessa isommassa tuottoerässä (b). Kitinaasi tunnistui samankokoisena molemmissa erissä IV kitinaasiluokan vasta-aineella. Kitinaasin kaltainen proteiini (KKP) näkyi toisessa tuottoerässä jakaantuneena kolmeen osaan ja tunnistui His-tag vasta-aineen lisäksi IV luokan kitinaasivasta-aineella toisin kuin ensimmäisessä tuottoerässä.

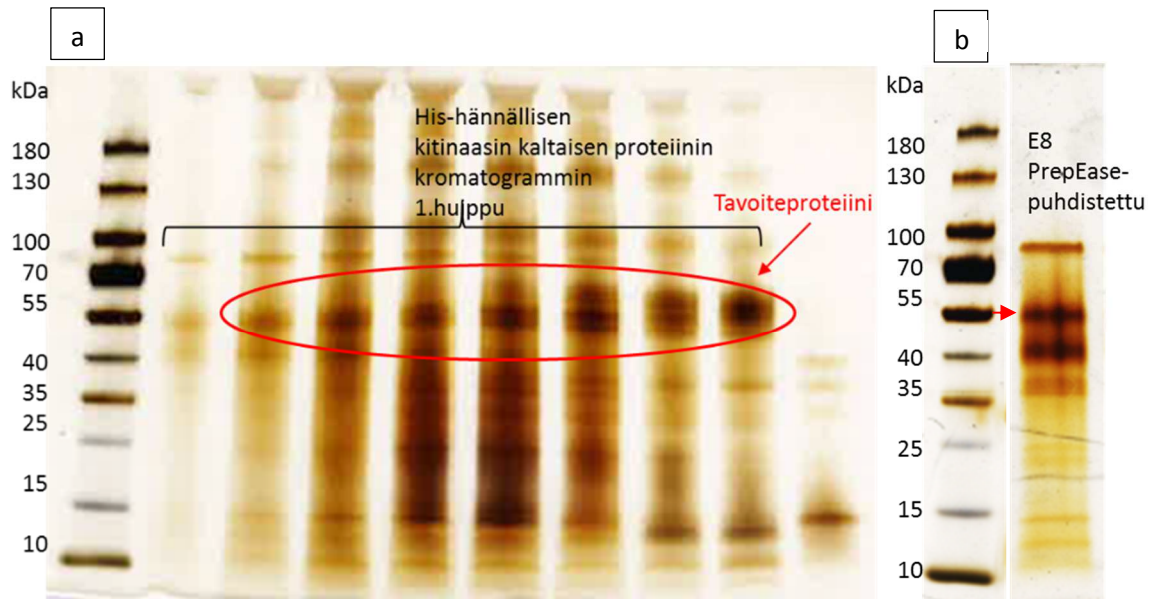
5.2.1 Puhdistus

P. pastoris -hiivassa tuotetut kitinaasit / kitinaasin kaltaiset proteiinit pyrittiin ensin kolajittelemaan geelisuodatuskromatografialla ja jatkopuhdistamaan affiniteettikromatografisesti kitiinihelmikolonnilla tai His-häntään perustuen sekä kationinvaihtokromatografialla. Kitinaasin puhdistaminen tuottoalustasta onnistui, mutta kitinaasin kaltaiset proteiinit eivät erottuneet *Pichian* omista proteiineista.

Geelisuodatuspylvään läpi ajettu His-hännällinen kitinaasin kaltainen proteiini jakaantui absorbanssia aallonpituudella 280 nm mitanneessa kromatogrammissa kahteen huippuun (kuva 10). Ensimmäisen huipun proteiinit eivät eluoituneet kolonnista kokonsa mukaisessa järjestyksessä vaan näytefraktiot sisälsivät kaikkia proteiinikokoluokkia, minkä vuoksi haluttua proteiinia ei saatu erilleen (kuva 11a). Myöskään jatkopuhdistus metalli-oniaffiniteettikromatografisesti His-häntään perustuen PrepEase-kitillä ei erottanut haluttua proteiinia (kuva 11b), vaan näytteeseen jäi suuri määrä *Pichian* omia proteiineja (= E8).

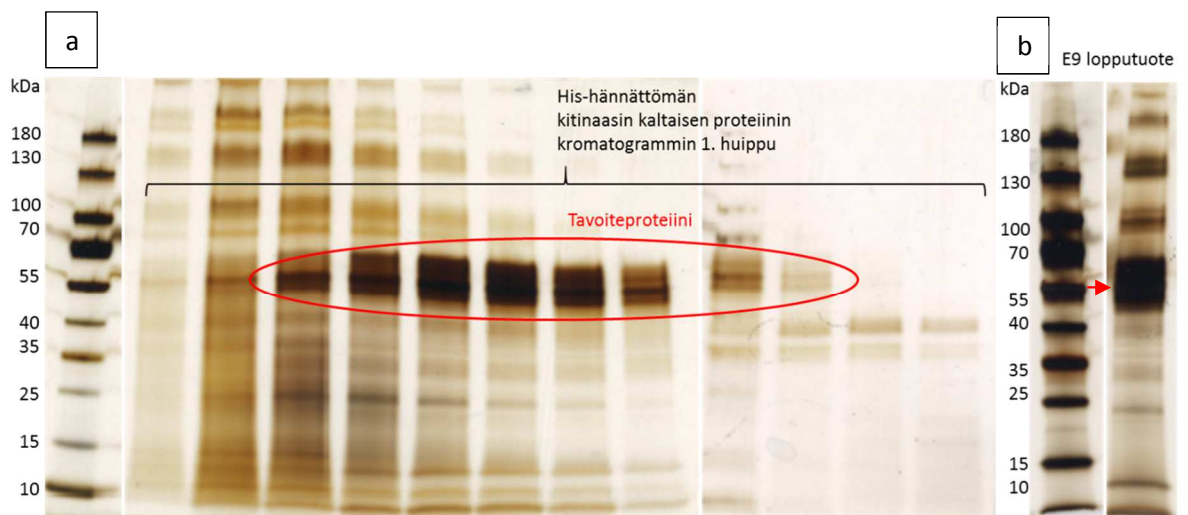


Kuva 10. Geelisuodatuskromatogrammi *Pichia*ssa tuotetun His-hännällisen kitinaasin kaltaisen proteiinin tuottoalustan proteiinien erottumisesta ÄKTAprime-nestetekromatografilla. Kuvaan muodostui kaksi huippua.



Kuva 11. *Pichiassa* tuotettu His-hännällinen kitinaasin kaltainen proteiini hopeavärjättyllä SDS-PAGE -geelillä. a) Tuottoalustan proteiinien geelisuodatuskromatogrammin ensimmäistä huippua kuvaavat proteiinijakeet sisälsivät kaikkia proteiinikokoluokkia. b) Metalli-ionaaffiniteettikromatografisen jatkopuhdistus PrepEase-kitillä ei erottanut kitinaasin kaltaista proteiinia (E8).

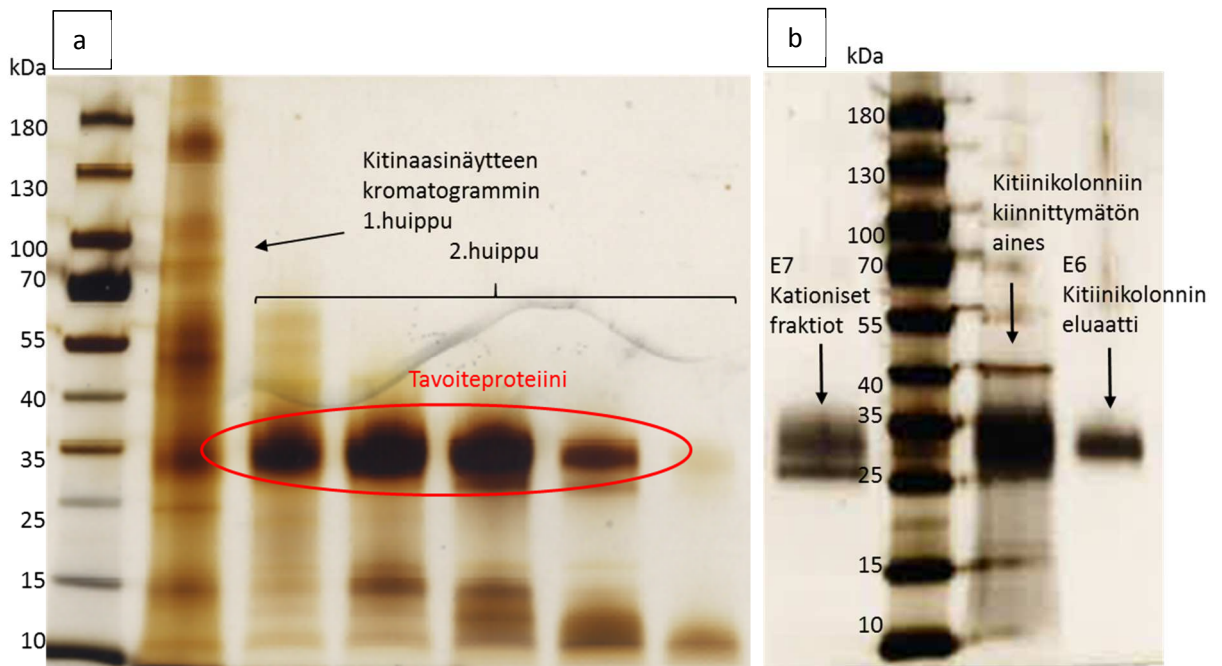
Geelisuodatuspylvään läpi ajettu His-hännätön kitinaasin kaltainen proteiini jakaantui kromatogrammissa odotetusti His-hännällisen vastineensa lailla myös kahteen huippuun (kuva 12). Ensimmäisen huipun proteiinit eivät eluoituneet kolonnista kokonsa mukai-



Kuva 12. *Pichiassa* tuotettu His-hännätön kitinaasin kaltainen proteiini hopeavärjättyllä SDS-PAGE -geelillä. a) Tuottoalustan proteiinien geelisuodatuskromatogrammin 1. huippua kuvaavat proteiinijakeet sisälsivät kaikkia proteiinikokoluokkia. b) Kitiinihelmiä ja kationinvaihtokromatografisesti puhdistettuun lopputuotteeseen jäi tavoiteproteiinin (→) lisäksi paljon *Pichian* omia proteiineja (E9).

sessä järjestyksessä, vaan näytefraktiot sisälsivät kaikkia proteiinikokoluokkia (kuva 12a), minkä vuoksi haluttua proteiinia ei saatu erilleen. Myöskään jatkopuhdistus kitinihelmipylväällä tai kationinvaihtokromatografisesti ei erottanut haluttua proteiinia (kuva 12b).

Myös geelisuodatuspylvään läpi ajettu kitinaasinäyte jakaantui kromatogrammissa kahteen huippuun (kuva 13a). Ensimmäinen huippu sisälsi kaikkia proteiinikokoluokkia. Jälkimmäisestä huipusta erottuivat hopeavärjättyllä SDS-PAGE -geelillä halutun kokoisen proteiinin sisältäneet fraktiot, joista yhdistetyn konsentraatin proteiini tarttui kitiniipylväeseen (= E6). Kuitenkin suuri osa noin 32 kDa:n kokoisesta kitinaasista jäi kiinnittymättä (kuva 13b), minkä vuoksi pylvään sitoutumatta ohittanut näyte sekä pesuliuoksen proteiinit puhdistettiin seuraavaksi kationinvaihtokromatografialla. Sen tuloksena hopeavärjättyllä SDS-PAGE -geelillä nähtiin kaksi lähekkäistä proteiinivyöhykettä (kuva 13b), noin 27 ja 32 kDa (= E7).

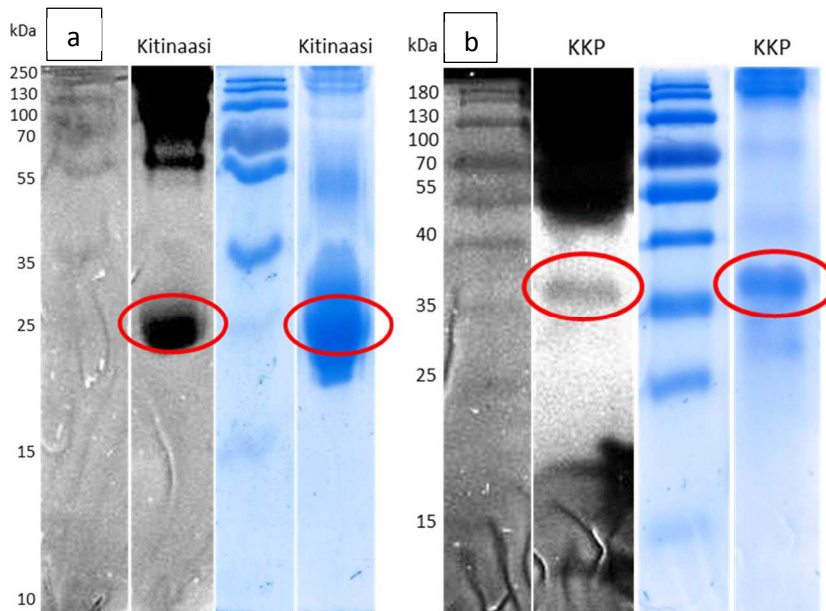


Kuva 10. *Pichiassa* tuotettu kitinaasi hopeavärjättyllä SDS-PAGE -geelillä. a) Tuottoalustan proteiinien geelisuodatuskromatogrammin kahta huippua kuvaavat proteiinifraktiot. b) Jatkopuhdistuksen tuotokset: kitinihelmipylväaseen kiinnittymättömät proteiinit, kitinihelmipylvään eluaatti (E6) ja kationinvaihtokromatografisesti erotetut kationiset fraktiot (E7).

5.2.2 Entsyymiaktiivisuusanalyysit

P. pastoris -hiivassa tuotettujen kitinaasien / kitinaasien kaltaisten proteiinien kitinolyytistä aktiivisuutta tarkasteltiin sekä glykolikitiiniä sisältävällä polyakryyliamidigeelillä että agarosimaljalla useissa eri puhdistusprosessin vaiheissa. Tuotettujen kitinaasien aktiivisuuden voi geelillä erottaa vyöhykkeen koon ja intensiteetin perusteella, mutta pisara-analyysissä maljalla mukana saattoivat vaikuttaa myös mahdolliset *Pichian* omat kitinaasit, joista kitinaasin kaltaisia proteiineja ei saatu erotettua.

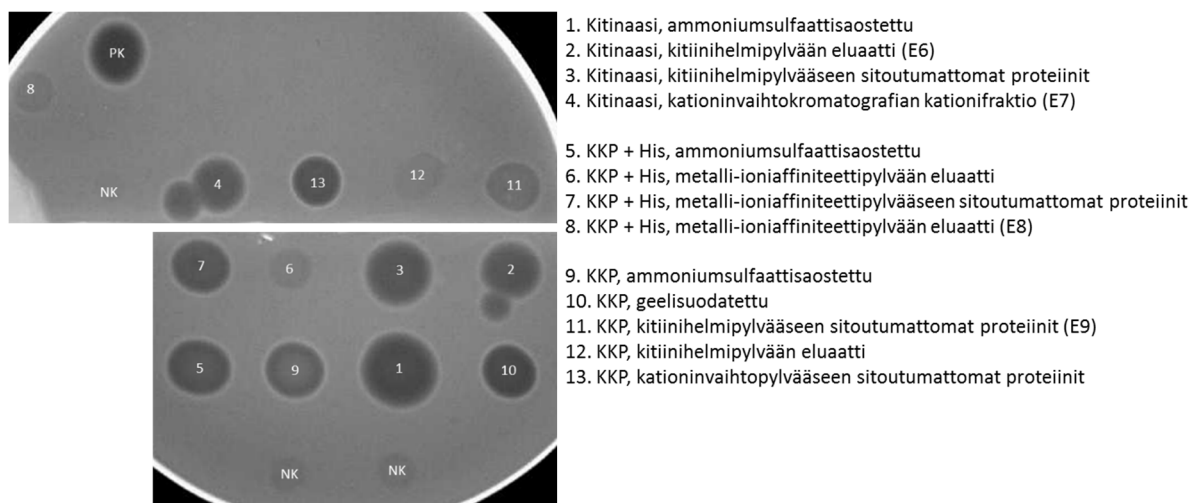
P. pastoris -hiivassa tuotetussa kitinaasinäytteessä konsentroituna 50 mM natriumasetaattipuskuriin pH 5,0 ammoniumsulfaattisaostuksen jälkeen havaittiin aktiivisuutta glykolikitiinigeelillä noin 25 kDa:n kokoisessa vyöhykkeessä (kuva 14a). Myös kitinaasin kaltaisen proteiinin tuottoalustan proteiineissa konsentroituna 50 mM natriumasetaattipuskuriin pH 5,0 ammoniumsulfaattisaostuksen jälkeen todettiin glykolikitiiniaktiivisuutta noin 37 kDa:n kokoisessa vyöhykkeessä (kuva 14b).



Kuva 14. *Pichiassa* tuotettu His-hännätön a) kitinaasi ja b) kitinaasin kaltainen proteiini (KKP) vielä tuottoalustan proteiineista erottamattomina osoittivat aktiivisuutta glykolikitiinigeelillä (mustavalkokuvat). Kitiinigeelien vieressä oikealla puolella samat geelit Calcofluor White -käsittelyn jälkeen Coomassie-värjättyinä (sinivalkokuvat).

Molemmat proteiinit olivat His-hännättömiä. Koska proteiinit ajautuvat aktiivisuusgeelillä SDS:n vähentämisen ja denaturoimattomuuden vuoksi eri tavoin kuin denaturoivalla geelillä, eivät proteiinien koot välttämättä vastaa SDS-PAGE - ja sitä seuraavan western blot -analyysin tuloksia. Proteiinien kokoluokasta ja suuresta pitoisuudesta johtuen niiden pääteltiin kuitenkin olevan tuoton kohteena olleita proteiineja eikä *Pichian* omia kitinaaseja. His-hännällinen kitinaasin kaltainen proteiini ei osoittanut missään vaiheessa aktiivisuutta glykolikitiinille.

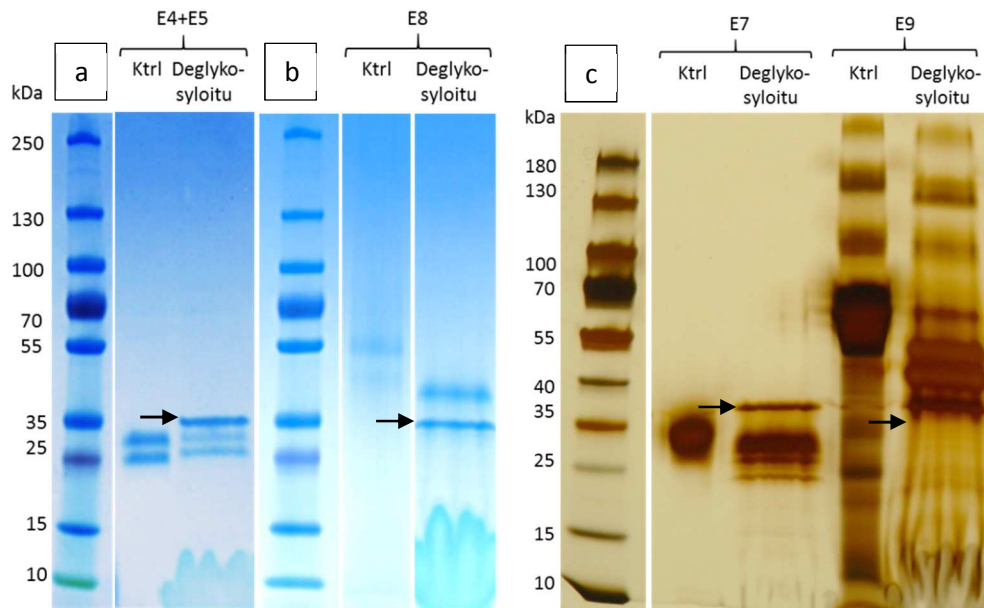
Glykolikitiinimaljoilla tehty pisara-analyysi osoitti ammoniumsulfaattisaostuksen jälkeen kaikille näytteille glykolikitiiniaktiivisuutta (kuva 15), kun kyseessä oli vielä puhdistamaton totaaliproteiiniseos. Kitinaasinäytteet ja His-hännättömän kitinaasin kaltaisen proteiinin tuottoalustan proteiiniseos olivat maljalla aktiivisia myös kaikkien puhdistusvaiheiden jälkeen. Sen sijaan His-hännällisen kitinaasin kaltaisen proteiinin tuottoalustan proteiiniseos menetti aktiivisuuttaan metalli-ioni-affiniteettipuhdistuksessa ja pylvään pesuliuos osoitti suurempaa glykolikitiiniaktiivisuutta kuin eluaatti.



Kuva 15. Entsyymiaktiivisuutta osoittava pisara-analyysi *Pichiassa* tuotetuille kitinaaseille / kitinaasien kaltaisille proteiineille Calcofluor-käsitellyillä glykolikitiinimaljoilla. Substraatin pilkkoutuminen näkyy geelillä tummina alueina: mitä tummempi ja laajempi rengas, sitä enemmän glykolikitiiniaktiivisuutta. NK = negatiivinen kontrolli, PK = positiivinen kontrolli, KKP = kitinaasin kaltainen proteiini.

5.2.3 Deglykosylaatio

Kaikkien *P. pastoris* -hiivassa tuotettujen kitinolyyttisten entsyymien (E7, E8 ja E9) koko SDS-PAGE -geelillä muuttui pienemmäksi deglykosylaation jälkeen (kuva 16b ja 16c). Sen sijaan suoraan kuusisoluviljelmästä eristettyjen kitinaasien (E4 ja E5) koossa ei tapahtunut muutoksia deglykosylaation jälkeen (kuva 16a).



Kuva 16. Deglykosyloimattomat kontrollinäytteet ja deglykosyloidut kitinaasit / kitinaasin kaltaiset proteiinit Coomassie ja hopeavärjättyillä SDS-PAGE -geeleillä. a) Kuusisolususpensioviljelyalustasta eristetyt kationinvaihdolla puhdistetut kitinaasit (E4, E5). b) *Pichiassa* tuotettu metalli-ioniaffiniteettikromatografisesti puhdistettu His-hännällinen kitinaasin kaltainen proteiini (E8). c) *Pichiassa* tuotettu kitinaasi (E7) ja His-hännättömän kitinaasin kaltaisen proteiinin tuottoalustaproteiineja (E9). Deglykosylaatioissa käytetty PNGase F -amidaasi näkyy geeleillä selkeinä terävinä 36 kDa:n kokoisina vyöhykkeinä (→).

5.3 Hiilihydraattimikrokalvoanalyysit

Kuusisolususpensioviljelmän alusta, siitä eristetyt kitinaasit ja *P. pastoris* -hiivassa tuotetut kitinaasit ja kitinaasien kaltaiset proteiinit analysoitiin eri puhdistusvaiheiden jälkeen hiilihydraattimikrokalvoilla entsyymien käyttämien substraattivaihtoehtojen kar-toittamiseksi. Kuusisoluseinärakenteiden pilkkoutumista eri entsyymien vaikutuksesta tarkasteltiin useiden eri vasta-aineiden ja hiilihydraattiin sitoutuvan yksikön avulla. Ana-

lyysitulokset on esitetty 12 lukuarvokarttana, joissa nähdään kaksi koetta (entsyymi lisätty substraatile 1) ennen CDTA- ja NaOH-uuttoja tai 2) CDTA- ja NaOH-uuttojen jälkeen) kolmesta eri entsyymeillä suoritetusta analyysistä. Jokaista kuutta koetta on tarkasteltu sekä näytelaimennoksien signaaliarvojen keskiarvoina sekä kerranteiden signaaliarvojen keskiarvoina. Jos substraatin hajoamista kuvaava signaalin arvo esiintyy vain toisessa kerranteessa tai pelkästään laimeimmissa laimennoksissa, tulos ei todennäköisesti kuvaa todellista substraatin hajoamista vaan on virheellinen. Koska arvoa 1 suuremmat signaalilukemat viittaavat substraattien pilkkoutumiseen, kaikki kahta pienemmät arvot on jätetty taulukoista pois. Suurin mahdollinen signaalin arvo on 20.

5.3.1 Analyysi 1, koe 1

Hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä 1 entsyyminä toimivat puhdistamattoman konsentroidun kuusisolukkoviljelyalustan proteiinit sekä positiivisena kontrollina (PK) kaupallinen bakteerikitinaasi. Kokeessa 1 entsyymi lisättiin substraatile ennen pektiinien ja hemiselluloosan uuttoa.

Kuusen soluviljelyalusta (E1) aikaansai useiden polysakkaridien hajoamista eri kuusimateriaaleissa (taulukko 8). Positiiviseen kontrolliin (PK) verrattuna signaalien arvot olivat korkeampia ja niitä oli enemmän. CDTA-uuton jälkeen lievää pektiinirakenteiden hajoamista osoittavia signaaliarvoja havaittiin vain ligniinissä (S4), mutta NaOH:lla uutettujen hemiselluloosapohjaisten rakenteiden hajoamista todettiin kaikissa substraateissa, kuusisoluisissa (S1), kehittyvässä (S2) ja kypsässä (S3) puussa sekä ligniinissä (S4) (taulukko 8). Suurimmat signaaliarvot E1-soluviljelyalustalle tuottivat rakenneproteiini ekstensiini (JIM20, LM1), ksylaani (LM10, LM23), arabinoksylaani (LM11), ksyloglukaani (LM15, LM25) ja mannaani (LM21, LM22). Solukkoviljelmän entsyymit hajottivat erityisesti ekstensiiniä ja ksyloglukaania kuusisoluista (S1), ksylaania ja mannaania kehittyvästä puusta (S2) ja arabinoksylaania kehittyvästä puusta (S2) ja ligniinistä (S4). Näistä kuusisolujen ksyloglukaanivaste sekä kehittyvän puun mannaanivaste havaittiin voimakkaana molemmissa kerranteissa ja kaikissa laimennoksissa. Positiivinen kontrolli (PK) tuotti vain lievää ksylaani/arabinoksylaani (LM11) pilkkoutumista ligniinisubstraatissa (S4) osoittavia signaaliarvoja NaOH-uuton jälkeen (taulukko 8).

Taulukko 8. Substraatin hajoamista osoittavat signaalit 1. hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä, kun entsyymit on lisätty substraatile ennen pektiinien ja hemiselluloosan uuttoja CDTA- ja NaOH-liuoksilla. Entsyyminä toimivat puhdistamattoman konsentroidun kuusisolukkoviljelyalustan proteiinit (E1) ja positiivisena kontrollina (PK) kaupallinen bakteerikitinaasi. Taulukkoon 8a on laskettu keskiarvo neljästä laimennoksesta ja taulukkoon 8b kahdesta kerranteesta. Vain arvoa 1 suuremmat signaalinarvot ovat mukana. AGP = arabinogalaktaaniproteiini, HG = homogalakturnaani, S1 = solukkoviljelmän solut, S2 = kehittyvä puu, S3 = kypsä puu, S4 = ligniini.

a									
Koe 1: Entsyymien lisäys ennen uuttoja									
Keskiarvot laimennoksista									
Epitooppi									
Entsyymi	Substraatti	Uutto	Kerranne	Celluloosa	HG	AGP	Ekstensiini	Galaktani	Arabinani
E1	S4	CDTA	1		3				
E1	S4	CDTA	2		2				
E1	S1	NaOH	1	2			2		6
E1	S1	NaOH	2	3		2	3	6	4
E1	S2	NaOH	1	2					2
E1	S2	NaOH	2						2
E1	S3	NaOH	1						2
E1	S3	NaOH	2						2
E1	S4	NaOH	1						2
E1	S4	NaOH	2						2
PK	S4	CDTA	1	2	2			2	2
PK	S1	NaOH	1					2	
PK	S2	NaOH	1					2	2
PK	S4	NaOH	1					2	2
PK	S4	NaOH	2					2	2

b									
Koe 1: Entsyymien lisäys ennen uuttoja									
Keskiarvot kerranteista									
Epitooppi									
Entsyymi	Substraatti	Uutto	Laimennos	Celluloosa	HG	AGP	Ekstensiini	Galaktani	Arabinani
E1	S2	CDTA	1						3
E1	S4	CDTA	1		2				2
E1	S4	CDTA	2		2				2
E1	S4	CDTA	3		2				2
E1	S1	NaOH	1	2		2	2	2	3
E1	S1	NaOH	2	3		2	3	2	6
E1	S1	NaOH	3	2		2	4	3	5
E1	S1	NaOH	4						3
E1	S2	NaOH	1						2
E1	S2	NaOH	2						2
E1	S2	NaOH	3						2
E1	S2	NaOH	4						2
E1	S3	NaOH	1						2
E1	S3	NaOH	2						2
E1	S3	NaOH	3						2
E1	S3	NaOH	4						2
E1	S4	NaOH	1	2					3
E1	S4	NaOH	2						2
PK	S2	CDTA	1						2
PK	S4	CDTA	1						2
PK	S4	CDTA	3						2
PK	S2	NaOH	1						2
PK	S2	NaOH	2						2
PK	S3	NaOH	1						2
PK	S4	NaOH	1	2					2
PK	S4	NaOH	2						2
PK	S4	NaOH	3						2

5.3.2 Analyysi 1, koe 2

Hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä 1 entsyyminä toimivat puhdistamattoman, konsentroidun kuusisolukkoviljelyalustan proteiinit sekä positiivisena kontrollina (PK) kaupallinen bakteerikitinaasi. Kokeessa 2 entsyymi lisättiin substraatile pektiinien ja hemiselluloosan uuton jälkeen.

Kun entsyymi oli lisätty substraatille vasta pektiinien ja hemiselluloosan uuton jälkeen, oli substraatin hajoamista osoittavien signaalien määrä ja taso alhaisempi kuin lisättäessä entsyymi substraatille ennen uuttoja (taulukot 8 ja 9). Kuusen soluviljelyalusta (E1) pilkkoi kehittyvästä puusta (S2) kalloosia (BS-400-2) sekä mannaania (LM22), mutta vaikutus ei tullut näkyviin kaikilla laimennoksilla (taulukko 9). Positiivinen kontrolli (PK) reagoi CDTA-uuton jälkeen voimakkaimmin selluloosaan (CBM3a) ja ksyloglukaaniin (LM15 ja LM25), mutta tulos näkyy vain toisessa kerranteessa, mikä viittaa epäspesifiseen reaktioon.

Taulukko 9. Substraatin hajoamista osoittavat signaalit 1. hiilihydraattimikrokalvoanalyyysissä, kun entsyymit on lisätty substraatille CDTA- ja NaOH-uuttojen jälkeen. Entsyyminä toimivat puhdistamattoman konsentroidun kuusisolukkoviljelyalustan proteiinit (E1) ja positiivisena kontrollina (PK) kaupallinen bakteerikitinaasi. Taulukkoon 9a on laskettu keskiarvo neljästä laimennoksesta ja taulukkoon 9b kahdesta kerranteesta. Vain arvoja 1 suuremmat signaalinarvot ovat mukana. HG = homogalakturnaani, S1 = solukkoviljelmän solut, S2 = kehittyvä puu, S3 = kypsä puu, S4 = ligniini.

a

Koe 2: Entsyymien lisäys uuttojen jälkeen

Keskiarvot laimennoksista

				Epitooppi						
				Kalloosi	Selluloosa	Ksyyloglukaani	HG	Mannaani	Mannaani	Ksyyloglukaani
Entsyymi	Substraatti	Uutto	Kerranne	BS-400-2	CBM3a	LM15	LM19	LM21	LM22	LM25
E1	S2	NaOH	1.	2					2	
E1	S2	NaOH	2.	2					2	
PK	S1	CDTA	2.		2	2				3
PK	S1	NaOH	1.						2	
PK	S1	NaOH	2.				2			
PK	S2	NaOH	1.	2						
PK	S2	NaOH	2.	2						2

b

Koe 2: Entsyymien lisäys uuttojen jälkeen

Keskiarvot kerranteista

				Epitooppi														
				Kalloosi	Selluloosa	HG	Ekstensiini	Ksylaani	Ksyyloglukaani	HG	HG	HG	Mannaani	Mannaani	Ksylaani	Ksyyloglukaani		
Entsyymi	Substraatti	Uutto	Laimennos	BS-400-2	CBM3a	JIM7	LM1	LM11	LM15	LM18	LM19	LM20	LM21	LM22	LM23	LM25		
E1	S1	NaOH	1.	2														
E1	S2	NaOH	1.	6														
E1	S2	NaOH	2.	2														
E1	S2	NaOH	3.											4				
E1	S4	NaOH	1.										2					
PK	S1	CDTA	1.		4				4						2	6		
PK	S1	CDTA	3.			2					2							
PK	S1	NaOH	3.										2					
PK	S2	NaOH	1.	2														
PK	S2	NaOH	2.	2											2			
PK	S2	NaOH	3.											2				
PK	S3	NaOH	1.								2							
PK	S3	NaOH	4.											2				
PK	S4	NaOH	1.											2				

5.3.3 Analyysi 2, koe 1

Hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä 2 entsyymeinä toimivat kuusisolukkoviljelmästä eristetyt ja puhdistetut proteiinit: kitiinipylvääseen sitoutumattomat proteiinit (E2), kitiinipylvään eluaatti (E3), kitiinipylvään eluaatista kationinvaihtokromatografisesti puhdistetut kitinaasit (E4 ja E5) sekä positiivisena kontrollina (PK) toiminut kaupallinen bakteerikitinaasi. Kokeessa 1 entsyymi lisättiin substraatile ennen pektiinien ja hemiselluloosan uuttoja.

Kun entsyymi lisättiin substraatile ennen CDTA- ja NaOH-uuttoja, CDTA-uutetun näytteen homogalakturnaanirakenne (JIM7) pilkkoontui molemmissa kerranteissa ja kolmessa laimennoksessa vain ligniinisubstraatisa (S4) kitiinipylvääseen sitoutumattomien proteiinien toimesta (E2) (taulukko 10). Kaikki entsyymit aikaansaitivat pääasiassa hemiselluloosapolysakkaridien hajoamista, mitä tapahtui eniten kehittyvässä (S2) mutta myös kypsässä (S3) puussa (taulukko 10). Suurimmat signaaliarvot puusubstraateissa tuottivat (1→4)-β-D-mannaanit (BS-400-4, LM21 ja LM22) kaikilla entsyymeillä, myös positiivisella kontrollilla. Tämä havaittiin kehittyvän puun (S2) osalta molemmissa kerranteissa ja kaikilla laimennoksilla. Kitiinipylvääseen sitoutumattomat proteiinit (E2) sekä kationisten kitinaasien seos (E4+E5) hajottivat lievästi kehittyvän puun ksyloglukaaneja, mutta se havaittiin vain yhdellä vasta-aineella (LM15) kolmesta (taulukko 10).

Taulukko 10. Substraatin hajoamista osoittavat signaalit 2. hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä, kun entsyymit on lisätty substraatile ennen CDTA- ja NaOH-uuttoja. Entsyymeinä toimivat kuusisolukkoviljelmän kitiinipylvääseen sitoutumattomat proteiinit (E2), kitiinipylvään eluaatti (E3) ja kationinvaihtokromatografisesti puhdistetut kitinaasit (E4 ja E5) ja positiivisena kontrollina (PK) kaupallinen bakteerikitinaasi. Taulukkoon 10a on laskettu keskiarvo neljästä laimennoksesta ja taulukkoon 10b kahdesta kerranteesta. Vain arvoa 1 suuremmat signaaliarvot ovat mukana. AGP = arabinogalaktaaniproteiini, HG = homogalakturnaani, S1 = solukkoviljelmän solut, S2 = kehittyvä puu, S3 = kypsä puu, S4 = ligniini.

b

Koe 1: Entsyymien lisäys ennen uuttoja												
					Keskiarvot laimennoksista							
					Epitooppi							
Entsyymi	Substraatti	Uutto	Kerranne	BS-400-4	Mannaani	Selluloosa	HG	Galaktaani	Ksylaani	Ksyyloglukaani	Mannaani	Mannaani
				CBM3a								
				JIM7								
				LM5								
				LM11								
				LM15								
				LM21								
				LM22								
E2	S2	CDTA	1.					2				
E2	S2	CDTA	2.					2				
E2	S3	CDTA	1.	2								
E2	S3	CDTA	2.	2								
E2	S4	CDTA	1.				2					
E2	S4	CDTA	2.				2					
E2	S2	NaOH	1.	4						2	7	4
E2	S2	NaOH	2.	5	2			2		2	8	4
E2	S3	NaOH	1.	2					2		2	2
E2	S3	NaOH	2.								2	2
E3	S2	CDTA	1.					2				
E3	S3	CDTA	1.	2								
E3	S3	CDTA	2.	2								
E3	S2	NaOH	2.	4	2					2	5	4
E3	S3	NaOH	1.	2							2	2
E3	S3	NaOH	2.	2							2	2
E4+E5	S3	CDTA	2.	2								
E4+E5	S2	NaOH	1.	4						2	6	4
E4+E5	S2	NaOH	2.	3						2	4	4
E4+E5	S3	NaOH	1.	2							2	2
E4+E5	S3	NaOH	2.	2							2	2
PK	S2	NaOH	1.	3							4	4
PK	S2	NaOH	2.	5	2					2	8	

				Koe 1: Entsyymien lisäys ennen uuttoja															
				Keskiarvot kerranteista															
				Epitooppi															
				Mannaani	Selluloosa	HG	HG	AGP	Ekstensiini	Ekstensiini	AGP	Galaktaani	Ksyliaani	Arabinaani	Ksyloglukaani	HG	Mannaani	Mannaani	Ksyloglukaani
Entsyymi	Substraatti	Uutto	Laimennos	BS-400-4	CBM3a	JIM5	JIM7	JIM13	JIM20	LM1	LM2	LM5	LM11	LM13	LM15	LM19	LM21	LM22	LM24
E2	S2 CDTA		2.									2							
E2	S3 CDTA		1.	2													2		
E2	S3 CDTA		3.	2															
E2	S4 CDTA		1.				2												
E2	S4 CDTA		2.				2												
E2	S4 CDTA		3.				3												
E2	S1 NaOH		1.																2
E2	S2 NaOH		1.	3							3		2	2			4	7	
E2	S2 NaOH		2.	5	2							2			2		9	4	
E2	S2 NaOH		3.	6								2					5	3	
E2	S2 NaOH		4.	4													4		
E2	S3 NaOH		2.														2	2	
E2	S3 NaOH		3.	2													3	2	
E2	S3 NaOH		4.	4													3		
E2	S4 NaOH		3.						2										
E3	S2 CDTA		2.									2							
E3	S3 CDTA		1.	2															
E3	S3 CDTA		3.	2															
E3	S1 NaOH		1.					2	2										
E3	S2 NaOH		1.							2			2	2			2	2	
E3	S2 NaOH		2.	2													2	3	
E3	S2 NaOH		3.	2								2					2	2	
E3	S2 NaOH		4.	2													2		
E3	S3 NaOH		2.	2													3	3	
E3	S3 NaOH		3.	2													3	2	
E3	S3 NaOH		4.	4													3		
E4+E5	S3 CDTA		3.	2															
E4+E5	S1 NaOH		1.					2	2										
E4+E5	S2 NaOH		1.	3							3		2				3	7	
E4+E5	S2 NaOH		2.	4	2											2	6	4	
E4+E5	S2 NaOH		3.	4								2					5	3	
E4+E5	S2 NaOH		4.	4													4		
E4+E5	S3 NaOH		2.														2	2	
E4+E5	S3 NaOH		3.	2													3	2	
E4+E5	S3 NaOH		4.	4													3		
PK	S1 CDTA		1.														2		
PK	S2 CDTA		1.		2														
PK	S1 NaOH		1.					2	2										
PK	S2 NaOH		1.	3				2			3		2				3	7	
PK	S2 NaOH		2.	4	2											2	6	4	
PK	S2 NaOH		3.	5								2					5	3	
PK	S2 NaOH		4.	4													4		
PK	S3 NaOH		3.															2	

5.3.4 Analyysi 2, koe 2

Hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä 2 entsyymeinä toimivat kuusisolukkoviljelmästä eristetyt ja puhdistetut proteiinit: kitiinipylvääseen sitoutumattomat proteiinit (E2), kitiinipylvään eluaatti (E3), kitiinipylvään eluaatista kationinvaihtokromatografisesti puhdistetut kitinaasit (E4 ja E5) sekä positiivisena kontrollina (PK) toiminut kaupallinen bakteerikitinaasi. Kokeessa 2 entsyymi lisättiin substraatille pektiinien ja hemiselluloosan uuton jälkeen.

Kun entsyymi oli lisätty substraatille vasta CDTA- ja NaOH-uuttojen jälkeen, oli substraatin hajoamista osoittavien signaalien määrä ja taso jälleen alhaisempi kuin lisättäessä entsyymi substraatille ennen uuttoja (taulukot 10 ja 11). CDTA-uutetun ligniinin (S4) homogalakturnaanirakenteen (JIM7) pilkkoutumista kitiinipylvääseen sitoutumattomien proteiinien (E2) vaikutuksesta osoittavat signaaliarvot näkyivät edelleen molemmissa kerranteissa, kuten lisättäessä entsyymi ennen uuttoa, mutta vain vahvimalla laimennoksella (taulukko 11). Kitiinipylvään eluaatin (E3) sisältämät entsyymit olivat hajottaneet CDTA-uuton jälkeen kypsän puun arabinogalaktaaniproteiineja, mutta tämä näkyi vain yhdellä (JIM13) kolmesta vasta-aineesta niin, että molemmat kerranteet osoittivat substraatin pilkkoutumista vastaavaa arvoa. NaOH-uuton jälkeinen selkeä puusubstraattien (S2 ja S3) mannaanivaste tuli enää näkyviin vain kitiinipylvääseen sitoutumattomilla proteiineilla (E2) yhdellä kolmesta mannaanivasta-aineesta (BS-400-4) molemmilla kerranteilla mutta vain vahvimalla laimennoksella (taulukko 11). Lisäksi entsyymin lisäys substraatille uuttojen jälkeen toi esiin hienoista vastetta kitiinipylvääseen kiinnittymättömiltä proteiineilta (E2) molempien NaOH-uutettujen puusubstraattien (S2 ja S3) kalloosille (BS-400-2).

Taulukko 11. Substraatin hajoamista osoittavat signaalit 2. hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä, kun entsyymit on lisätty substraatile CDTA- ja NaOH-uuttojen jälkeen. Entsyymeinä toimivat kuusisolukkoviljelmän kitiinipylvääseen sitoutumattomat proteiinit (E2), kitiinipylvään eluaatti (E3) ja kationinvaihtokromatografisesti puhdistetut kitinaasit (E4 ja E5) ja positiivisena kontrollina (PK) kaupallinen bakteerikitinaasi. Taulukkoon 11a on laskettu keskiarvo kahdesta laimennoksesta ja taulukkoon 11b kahdesta kerranteesta. Vain arvoa 1 suuremmat signaalin arvot ovat mukana. AGP = arabinogalaktaaniproteiini, HG = homogalakturnaani, S1 = solukkoviljelmän solut, S2 = kehittyvä puu, S3 = kypsä puu, S4 = ligniini.

a									
Koe 2: Entsyymien lisäys uuttojen jälkeen									
Keskiarvot laimennoksista									
				Epitooppi					
				Kalboosi	Mannaani	RG-1	HG	AGP	AGP
Entsyymi	Substraatti	Uutto	Kerranne	BS-400-2	BS-400-4	INRA-RU1	JIM7	JIM8	JIM13
E2	S4	CDTA	1.				2		
E2	S4	CDTA	2.				2		
E2	S1	NaOH	1.	2		2			
E2	S2	NaOH	1.	2					
E2	S2	NaOH	2.	2					
E2	S3	NaOH	1.	2					
E2	S3	NaOH	2.	2					
E2	S4	NaOH	1.		2				
E2	S4	NaOH	2.		2				
E3	S2	CDTA	1.						3 2 2
E3	S3	CDTA	1.					2	
E3	S3	CDTA	2.					2	
E3	S1	CDTA	2.						2
PK	S1	CDTA	2.				2 2		2

b									
Koe 2: Entsyymien lisäys uuttojen jälkeen									
Keskiarvot kerranteista									
				Epitooppi					
				Kalboosi	Mannaani	HG	AGP	AGP	AGP
Entsyymi	Substraatti	Uutto	Laimennos	BS-400-2	BS-400-4	JIM7	JIM8	JIM13	LM2
E2	S1	CDTA	1.			2			
E2	S4	CDTA	1.			2			
E2	S1	NaOH	1.	2				2	
E2	S2	NaOH	1.	2					
E2	S3	NaOH	1.	2					2
E2	S4	NaOH	1.		3				2
E3	S1	CDTA	1.						2
E3	S2	CDTA	1.				2		
E3	S3	CDTA	1.			2 2 3			
E4+E5	S1	CDTA	1.						2
E4+E5	S2	CDTA	1.				2		
PK	S1	CDTA	1.			2			
PK	S2	CDTA	1.				2		
PK	S4	CDTA	1.				2		
PK	S1	NaOH	2.						2

5.3.5 Analyysi 2, entsyymien omat polysakkaridit

Hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä 2 oli mukana entsyymien testaus niiden itsensä sisältämien polysakkaridien osalta ilman CDTA- tai NaOH-uuttovaihetta. Koska kitiinipylvääseen sitoutumattomiin proteiineihin (E2), kitiinipylvään eluaattiin (E3), kationinvaihtokromatografisesti puhdistettuihin kitinaaseihin (E4 ja E5) sekä positiivisena kontrollina (PK) toimineeseen kaupalliseen bakteerikitinaasiin eikä negatiiviseen kontrolliin lisätty substraattia, ei hiilihydraattimikrokalvoanalyysin tulossignaalien arvoja voida käsitellä kuten substraattillisia näytteitä jakamalla negatiivisen kontrollin signaaliarvoa näytteen signaaliarvolla. Normaalistihan substraattillinen negatiivinen kontrolli sitoo substraatille spesifiset vasta-aineet, koska entsyymien sijaan lisätty puskuriliuos ei ole kyennyt hajot-

Entsyymien itsensä sisältämien polysakkaridien testaus Neljä kerrannetta																		
				Epitoooppi														
				Selluloosa	HG	HG	AGP	AGP	Ekstensiini	Ekstensiini	AGP	Galaktaani	Arabinaani	Arabinaani	Ksyloglukaani	HG	HG	Ksylaani
Entsyyminä	Substraatti	Uutto	Kerranne	CBM3a	JIM5	JIM7	JIM8	JIM13	JIM20	LM1	LM2	LM5	LM6	LM13	LM15	LM18	LM19	LM23
E2	-	-	1	3	8	3	6	12	12	7	2	5	8	4	4	14	16	5
E2	-	-	2	3	8	3	6	12	11	7	3	5	8	4	4	13	16	4
E2	-	-	3	3	8	3	6	12	12	7	2	5	8	4	4	13	16	5
E2	-	-	4	3	7	3	6	12	11	7	2	5	8	4	3	12	16	4
E3	-	-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E3	-	-	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E3	-	-	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E3	-	-	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E4	-	-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E4	-	-	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E4	-	-	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E4	-	-	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E5	-	-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E5	-	-	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E5	-	-	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E5	-	-	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PK	-	-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PK	-	-	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PK	-	-	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PK	-	-	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Puskuri	-	-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Puskuri	-	-	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Puskuri	-	-	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Puskuri	-	-	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Entsyymien itsensä sisältämien polysakkaridien testaus Keskiarvo neljästä kerranteesta																		
				Epitoooppi														
				Selluloosa	HG	HG	AGP	AGP	Ekstensiini	Ekstensiini	AGP	Galaktaani	Arabinaani	Arabinaani	Ksyloglukaani	HG	HG	Ksylaani
Entsyyminä	Substraatti	Uutto		CBM3a	JIM5	JIM7	JIM8	JIM13	JIM20	LM1	LM2	LM5	LM6	LM13	LM15	LM18	LM19	LM23
E2	-	-		3	8	3	6	12</										

5.3.6 Analyysi 3, koe 1

Hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä 3 entsyymeinä toimivat *P. pastoris* -hiivassa tuotetut: affiniteettikromatografisesti puhdistettu kitinaasi (E6), kationinvaihtokromatografisesti puhdistettu kitinaasi (E7), metalli-ioniaffiniteettikromatografisesti puhdistettu kitinaasin kaltainen proteiini (E8) ja kitinaasin kaltaisen proteiinin tuottoalustaproteiinit (E9) sekä positiivisena kontrollina (PK) kaupallinen bakteerikitinaasi. Kokeessa 1 entsyymi lisättiin substraatille ennen pektiinien ja hemiselluloosan uuttoja.

Kun entsyymi lisättiin substraatille ennen CDTA- ja NaOH-uuttoja, kaikkien entsyymien (E6-E9) sekä myös positiivinen kontrollin (PK) aikaansaamaa substraatin hajoamista havaittiin pääasiassa vain hemiselluloosarakenteissa NaOH-uuton seurauksena (taulukko 13). Tällöin rakenteiden pilkkoutumista tapahtui kuusisoluisissa (S1), kypsässä puussa (S3) tai ligniinissä (S4), muttei lainkaan kehittyvässä puussa (S2). Suurimmat signaaliarvot kaikilla entsyymeillä tuottivat kuusisolujen, kypsän puun ja ligniinin (1→4)-β-D-ksylaanit (LM10). Tämä havaittiin kypsän puun (S3), ligniinin (S4) ja myös positiivisen kontrollin (PK) osalta molemmissa kerranteissa ja vahvimalla laimennoksella. Kuusisolusubstraatin (S1) toinen kerranne ei yltänyt kertaakaan puusubstraatin (S3) pilkkoutumista osoittavaan arvoon, kun taas toinen kerranne tuotti jokaisella kerralla puu- (S3) ja ligniini- (S4) substraattien kanssa samankaltaisen vasteen. Sama kerranne tuotti lisäksi ainoana lievän vasteen kaikilla entsyymeillä (1→3)(1→4)-β-D-glukaanille kuusisolusubstraatissa (taulukko 13).

Analyysissa 3 mukana ollut entsyymi-substraatti-vuorovaikutuksen testaus ilman CDTA- tai NaOH-uuttoja tuotti homogalakturnaanirakenteen (JIM5) pilkkoutumista osoittavat signaaliarvot molemmissa kerranteissa ja 1. laimennoksessa vain ligniinisubstraatilla (S4), kun entsyyminä oli kitiinipylvään kitinaasieluaatti (E6) (taulukko 13).

Taulukko 13. Substraatin hajoamista osoittavat signaalit 3. hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä, kun entsyymit on lisätty substraatile ennen CDTA- ja NaOH-uuttoa. Entsyymeinä toimivat *P. pastoris* -hiivassa tuotetut affiniteettikromatografisesti puhdistettu kitinaasi (E6), kationinvaihtokromatografisesti puhdistettu kitinaasi (E7), metalli-oniaffiniteettikromatografisesti puhdistettu kitinaasin kaltainen proteiini (E8) ja kitinaasin kaltaisen proteiinin tuottoalustaproteiinit (E9) ja positiivisena kontrollina (PK) kaupallinen bakteerikitinaasi. Taulukkoon 13a on laskettu keskiarvo kolmesta laimennoksesta ja taulukkoon 13b kahdesta kerranteesta. Vain arvoja 1 suuremmat signaalin arvot ovat mukana. AGP = arabinogalaktaaniproteiini, HG = homogalakturnaani, S1 = solukko viljelmän solut, S2 = kehittyvä puu, S3 = kypsä puu, S4 = ligniini.

a				
Koe 1: Entsyymien lisäys ennen uuttoja				
Keskiarvot laimennoksista				
			Epitooppi	
			Glukaani	HG
			AGP	Ekstensini
			Galaktaani	Ksylaani
			Arabiinaani	HG
Entsyymi	Substraatti	Uutto	Kerranne	
E6	S2		BS-400-3	
E6	S4		JIM5	2
E6	S4		JIM13	2
E6	S4		JIM20	2
E6	S2	CDTA	LM5	2
E6	S1	NaOH	LM10	2
E6	S1	NaOH	LM13	2
E6	S3	NaOH	LM18	2
E6	S4	NaOH		
E7	S4		BS-400-3	
E7	S2	CDTA	JIM5	2
E7	S1	NaOH	JIM13	2
E7	S1	NaOH		
E7	S3	NaOH		
E7	S3	NaOH		
E7	S4	NaOH		
E8	S1	NaOH		
E8	S1	NaOH		
E8	S3	NaOH		
E8	S3	NaOH		
E8	S4	NaOH		
E8	S4	NaOH		
E9	S4		BS-400-3	
E9	S1	NaOH	JIM5	2
E9	S1	NaOH		
E9	S3	NaOH		
E9	S3	NaOH		
E9	S4	NaOH		
E9	S4	NaOH		
PK	S1	NaOH		
PK	S1	NaOH		
PK	S3	NaOH		
PK	S3	NaOH		
PK	S4	NaOH		
PK	S4	NaOH		

b				
Koe 1: Entsyymien lisäys ennen uuttoja				
Keskiarvot kerranteista				
			Epitooppi	
			Glukaani	HG
			Ekstensini	Ekstensini
			Galaktaani	Ksylaani
Entsyymi	Substraatti	Uutto	Laimennos	
E6	S1	NaOH	BS-400-3	
E6	S4	NaOH	JIM5	2
E6	S4	NaOH	JIM20	2
E6	S4	NaOH	LM1	2
E7	S1	NaOH	LM5	2
E7	S3	NaOH	LM10	2
E7	S4	NaOH	LM13	2
E8	S4	CDTA		
E8	S4	CDTA		
E8	S1	NaOH		
E8	S3	NaOH		
E8	S4	NaOH		
E9	S1	NaOH		
E9	S3	NaOH		
E9	S4	NaOH		
E9	S4	NaOH		
PK	S1	NaOH		
PK	S3	NaOH		
PK	S4	NaOH		

5.3.7 Analyysi 3, koe 2

Hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä 3 entsyymeinä toimivat *P. pastoris* -hiivassa tuotetut: affiniteettikromatografisesti puhdistettu kitinaasi (E6), kationinvaihtokromatografisesti puhdistettu kitinaasi (E7), metalli-oniaffiniteettikromatografisesti puhdistettu kitinaasin kaltainen proteiini (E8), kitinaasin kaltaisen proteiinin tuottoalustaproteiinit (E9) sekä positiivisena kontrollina (PK) toiminut kaupallinen bakteerikitinaasi. Kokeessa 2 entsyymi lisättiin substraatile pektiinien ja hemiselluloosan uuton jälkeen.

CDTA-uutettujen kuusisolujen (S1) ja kehittyvän puun (S2) arabinogalaktaaniproteiinirakenteen (JIM13) pilkkoutumista havaittiin positiivisen kontrollin (PK) ollessa entsyyminä (taulukko 14). Kokeessa 1 todettua johdonmukaista vastetta (1→4)-β-D-ksyylaanille

Taulukko 14. Substraatin hajoamista osoittavat signaalit 3. hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä, kun entsyymit on lisätty substraatile CDTA- ja NaOH-uuttojen jälkeen. Entsyymeinä toimivat *P. pastoris* -hiivassa tuotetut affiniteettikromatografisesti puhdistettu kitinaasi (E6), kationinvaihtokromatografisesti puhdistettu kitinaasi (E7), metalli-oniaffiniteettikromatografisesti puhdistettu kitinaasin kaltainen proteiini (E8) ja kitinaasin kaltaisen proteiinin tuottoalustaproteiinit (E9) ja positiivisena kontrollina (PK) kaupallinen bakteerikitinaasi. Taulukkoon 14a on laskettu keskiarvo kolmesta laimennoksesta ja taulukkoon 14b kahdesta kerranteesta. Vain arvoja 1 suuremmat signaalinarvot ovat mukana. AGP = arabinogalaktaaniproteiini, HG = homogalakturnaani, S1 = solukkoviljelmän solut, S2 = kehittyvä puu, S3 = kypsä puu, S4 = ligniini.

a			
Koe 2: Entsyymin lisäys uuttojen jälkeen			
Keskiarvot laimennoksista			
Epitooppi			
Entsyymi	Substraatti	Uutto	Kerranne
E7	S2	CDTA	1.
E7	S4	NaOH	1.
E8	S3	CDTA	1.
E9	S2	NaOH	1.
E9	S2	NaOH	2.
PK	S1	CDTA	1.
PK	S1	CDTA	2.
PK	S2	CDTA	1.
PK	S2	CDTA	2.
PK	S3	CDTA	1.
PK	S1	NaOH	1.
PK	S1	NaOH	2.
PK	S2	NaOH	2.
PK	S3	NaOH	2.

b			
Koe 2: Entsyymin lisäys uuttojen jälkeen			
Keskiarvot kerranteista			
Epitooppi			
Entsyymi	Substraatti	Uutto	Laimennos
E7	S1	CDTA	2.
E7	S2	CDTA	2.
E7	S2	NaOH	2.
E7	S4	NaOH	1.
E8	S1	CDTA	1.
E9	S2	NaOH	1.
PK	S1	CDTA	1.
PK	S1	CDTA	2.
PK	S2	CDTA	1.
PK	S2	CDTA	2.
PK	S3	CDTA	1.
PK	S1	NaOH	2.
PK	S2	NaOH	2.
PK	S3	NaOH	1.

(LM10) kaikilla entsyymeillä ja kolmella NaOH-uutetulla substraatilla neljästä ei nähdä lainkaan, kun entsyymi on lisätty substraatille uuttojen jälkeen (taulukot 13 ja 14). Sen sijaan kitinaasin kaltaisen proteiinin tuottoalustaproteiinit (S9) aikaansaivat NaOH-uutetun kehittyvän puun (S2) kalloosirakenteen (BS-400-2) lievää pilkkoutumista ja positiivinen kontrolli (PK) NaOH-uutettujen kuusisolujen (S1) mannaanin (LM22) hajoamista (taulukko 14).

5.3.8 Analyysi 3, entsyymien omat polysakkaridit

Hiilihydraattimikrokalvoanalyysissa 3 oli mukana entsyymien testaus niiden itsensä sisältämien polysakkaridien osalta ilman CDTA- tai NaOH-uuttovaihetta. Koska *P. pastoris*-hiivassa tuotettuihin affiniteettikromatografisesti puhdistettuun kitinaasiin (E6), kationinvaihtokromatografisesti puhdistettuun kitinaasiin (E7), metalli-oniaffiniteettikromatografisesti puhdistettuun kitinaasin kaltaiseen proteiiniin (E8), kitinaasin kaltaisen proteiinin tuottoalustaproteiineihin (E9), positiivisena kontrollina (PK) toimineeseen kaupalliseen bakteerikitinaasiin eikä negatiiviseen kontrolliin lisätty substraattia, ei hiilihydraattimikrokalvoanalyysin tulossignaalien arvoja voida käsitellä kuten substraattillisia näytteitä jakamalla negatiivisen kontrollin signaaliarvoa näytteen signaaliarvolla (ks. luku 5.3.5, s. 59-60). Tämän vuoksi taulukossa 15 vain vertaillaan signaaliarvoja eikä negatiivisen kontrollin arvoja jaeta näyttearvoilla. Näytteistä ei tehty laimennoksia vaan kaksi kerrannetta. Entsyyminäytteissä ei havaittu polysakkarideja. Sen sijaan negatiivisena kontrollina toimineen puskuriliuoksen toisessa kerranteessa hiilihydraattimikrokalvoanalyysin signaaliarvot viittasivat sen sisältäneen mannaania (BS-400-4, LM21) ja ksyloglukaania (LM25).

Taulukko 15. Entsyymien polysakkarideja osoittavat signaalit 3. hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä ilman substraattia ja uuttokäsittelyjä. Entsyymeinä toimivat *P. pastoris* -hiivassa tuotetut affiniteettikromatografisesti puhdistettu kitinaasi (E6), kationinvaihtokromatografisesti puhdistettu kitinaasi (E7), metalli-ionaaffiniteettikromatografisesti puhdistettu kitinaasin kaltainen proteiini (E8) ja kitinaasin kaltaisen proteiinin tuottoalustaproteiinit (E9) ja positiivisena kontrollina (PK) kaupallinen bakteerikitinaasi.

Entsyymien sisältämien polysakkaridien testaus Kaksi kerrannetta									
					Epitooppi				
					Mannaani		Ksyloglukaani		
Entsyymi		Substraatti		Uutto	Kerranne				
						BS-400-4	LM21	LM25	
E6		-	-	-	1	0	0	0	
E6		-	-	-	2	0	0	0	
E7		-	-	-	1	0	0	0	
E7		-	-	-	2	0	0	0	
E8		-	-	-	1	0	0	0	
E8		-	-	-	2	0	0	0	
E9		-	-	-	1	0	0	0	
E9		-	-	-	2	0	0	0	
PK		-	-	-	1	0	0	0	
PK		-	-	-	2	0	1	1	
Puskuri		-	-	-	1	4	5	2	
Puskuri		-	-	-	2	0	0	0	

6 Tulosten tarkastelu

Aseptisen kuusisolususpensioviljelmän viljelyalustassa oli havaittu kitinaasien ilmene- mistä (Sundberg, Kärkönen ja Teeri 2010, julkaisematon) ja kitinolyttistä entsyymiaktiivisuutta (Porkka ym. 2013). Alustasta eristettiin ja puhdistettiin kaksi kitinaasia, jotta voitiin hiilihydraattimikrokalvoanalyysillä tutkia, toimivatko ne jollakin kuusen omalla polysakkaridisubstraatilla kitiinin sijaan. Koska haluttiin varmistua kuusisoluviljelmän kitinaasien puhtaudesta substraatteja testattaessa, tuotettiin substraattianalyysiin myös sekvenssiltään kuusisoluviljelmästä eritetyn kitinaasin kanssa samankaltaista kitinaasia sekä kitinaasin kaltaista puussa ilmenevää proteiinia *P. pastoris* -hiivassa. Kitinaaseja ja kitinaasin kaltaisia entsyymejä tarkasteltiin substraattivaihtoehtoja määrittäneen hiilihydraattimikrokalvoanalyysin lisäksi myös koon, glykosylaatioiden esiintymisen, entsyymiaktiivisuuden ja kitinaasiluokan suhteen SDS-PAGE -, glykolikitiini-PAGE - ja western blot -analyysillä.

6.1 Kuusisolususpensioviljelmän alustasta eristetyt kitinaasit

Viljelyalustasta saatiin ioninvaihtokromatografialla puhdistettua kaksi kationista kitinaasia, kooltaan noin 25 ja 30 kDa, jotka osoittivat aktiivisuutta glykolikitiinille (kuvat 5 ja 6). Koska kitinaaseja ei saatu täysin erotettua toisistaan, jatkoanalyysit tehtiin niiden seoksesta. Erottaminen olisi mahdollista tuottamalla puhdistettavia entsyymejä suurempia määriä, jolloin jatkoanalyysihin olisi riittävästi proteiineja valittaviksi vain kromatografisten jakeiden ääripäistä, joissa kitinaasit eivät ole sekoittuneet. Western blot-analyysissa sekä I että IV luokan kitinaasivasta-aineet tunnistivat molemmat kitinaasit (kuva 7). Kitiinipylvääseen sitoutumattomia sekä suuri- että pienikokoisia glykolikitiinille aktiivisia alustaproteiineja todettiin runsaasti (kuvat 5 ja 6), mutta niitä ei onnistuttu erottamaan toisistaan kationin- tai anioninvaihtokromatografisesti eikä hydrofobisiin vuorovaikutuksiin perustuvalla kromatografialla (tuloksia ei ole esitetty). Kuusisoluviljelmän alustan kitiinipylvääseen kiinnittymättömien kitinaasien puhdistusta voitaisiin jatkaa kokoerotteluun perustuvalla kromatografialla tai affiniteettikromatografialla käyttäen kitiinihelmien sijaan jotain muuta kitiinimateriaalia, koska proteiinit osoittivat kuitenkin aktiivisuutta glykolikitiinille.

Deglykosylaatio PNGase F -amidaasientsyymillä säilytti kuusisoluviljelyalustasta kromatografisesti puhdistetut kitinaasit noin 25 ja 30 kDa:n kokoisina (kuva 16a). Tämä viittaa glykosylaatioiden puuttumiseen tai glykosylaatioon, jossa asparagiinin viereinen *N*-asetyyli-glukosamiini on kytkeytynyt α -(1 \rightarrow 3)-fukoosiin, koska silloin PNGase F -amidaasi ei kykene katkaisemaan oligosakkaridiosa proteiinista. Vaikka arvellaan, että monimutkaiset *N*-glykaanit eivät ole vakioympäristöoloissa kasvavien kasvien kehitykselle ja lisääntymiselle välttämättömiä, kasveille tyypilliset *N*-glykaanirakenteet kuten α -(1 \rightarrow 3)-fukoosi ovat korkeammissa kasveissa hyvin konservoituneita ja evoluution on oletettu estäneen niiden häviämistä (Lerouge ym. 1998, Strasser 2016).

6.2 *Pichia pastoris* -hiivassa tuotetut kitinolyyttiset entsyymit

P. pastoris -hiivassa tuotettujen kitinolyyttisten entsyymien koko ja tunnistaminen kitinaasivasta-aineilla erosi jonkin verran toisistaan kahdessa tuotantoerässä, vaikka tuotto tapahtui molemmissa samalla tavalla. Koska odotetut proteiinikoot (kitinaasilla

noin 30, kitinaasin kaltaisella proteiinilla 33 ja His-hännällisellä kitinaasin kaltaisella proteiinilla 35 kDa) olivat määritettyjä pienempiä ja His-hännällinen kitinaasin kaltainen proteiini tunnistui useana vyöhykkeenä (kuva 9), on mahdollista, että suuremmasta tuotterästä tehdyssä western blot -analyysissä on näytteen denaturointi jäänyt puutteelliseksi tai näyte on hajonnut proteaasien vaikutuksesta. *Pichia*-tuottosysteemi on voinut myös yliglykosyloidia tuotettuja proteiineja eri tavoin kahdella tuottokerralla. Kitinaasin kaltaisen proteiinin tunnistuminen kavolla useana vyöhykkeenä liittyi joko His-häntään tai kyseisen näytteen käsittelyyn, sillä vastaava hännätön kitinaasin kaltainen proteiini erottui kalvolla yhtenä vyöhykkeenä (kuva 9b). Kitinaasi (E7) tunnistui IV-kitinaasiluokan vasta-aineella (kuva 9), mutta kitinaasin kaltaisen proteiinin luokasta ei voida olla varmoja, koska sen tunnistuminen IV-kitinaasiluokan vasta-aineella tapahtui vain toisessa tuottoerässä. Kitinaasin kaltaisen proteiinin tuottuminen alustaan kuitenkin onnistui, eikä kyseessä ole *Pichian* oma entsyymi, koska His-tag -vasta-aine tunnisti sen molemmissa tuottoerissä (kuva 9).

Pichiassa tuotetun kitinaasin puhdistaminen viljelyalustasta onnistui affiniteettikromatografisesti kitiinipylväällä yhdeksi noin 32 kDa:n kokoiseksi proteiiniksi (E6) (kuva 13b). Kitinaasi tarttui kitiinikolonnein heikommin kuin vastaava kuusen solukkoviljelmästä eristetty kitinaasi aiemmin, minkä vuoksi kiinnittymättömän materiaali jatkokäsiteltiin ioninvaihtokromatografialla. Kationinvaihtokromatografia erotti kitiinipylvääseen sitoutumattomista proteiineista kaksi noin 28 ja 32 kDa:n kokoista jaetta (E7) (kuva 13b). Kitinaasin kaltaista proteiinia viljelyalustasta ei saatu puhdistettua (kuva 12b). His-hännällisen kitinaasin kaltaisen proteiinin viljelyalustasta onnistuttiin erottamaan pois joitakin suuri- ja pienikokoisimpia tuottoisäntä *Pichian* proteiineja (E8, kuva 11b), mutta His-hännätön kitinaasin kaltainen proteiini jouduttiin siirtämään jatkoanalyysiin tuottoalustassaan (E9, kuva 12b). Entsyymien geelisuodatuspylväässä erottumatta jääminen (kuvat 11a ja 12a) on saattanut johtua sen esiintymisestä jostakin syystä suurempana proteiiniyhdistelmänä, sillä proteiinien yhteenliittymistä oli havaittavissa jo ammoniumsulfattisaostuksen jälkeen. Geelisuodatuskromatografijakeiden sisältämien proteiinien suhteista päätellen tavoitellun kitinaasin kaltaisen proteiinin koko oli noin 55 kDa (kuvat 11 ja 12).

His-häntä proteiinin rakenteessa vähensi kitinolyyttistä aktiivisuutta glykolikitiinigeelillä, sillä polyakryyliamidigeelillä tehdyissä aktiivisuusmäärittelyissä vain His-hännättömissä entsyymeissä todettiin aktiivisuutta (kuva 14). Kitinaasi vaikutti kitinaasin kaltaista proteiinia aktiivisemmalla, mutta pitoisuus saattoi vaikuttaa aktiivisuuteen kitinaasin kaltaisen proteiinin ollessa osana alustan totaaliproteiineja ja näin pitoisuudeltaan laimeampi. Myös sitoutumiskyky kitiinipylvään kitiiniin oli kitinaasilla heikko ja kitinaasin kaltaisella proteiinilla olematon. Pisara-analyysissä glykolikitiiniä sisältävällä agarosigeelillä (kuva 15) osa todetuista aktiivisuuksista oli todennäköisesti peräisin *Pichian* omista kitinaaseista, koska niitä ei voitu erottaa koon perusteella pois kuten PAGE-geelillä. His-hännällisen kitinaasin kaltaisen proteiinin metalli-oniaffiniteettipuhdistus kuitenkin selkeästi vähensi alustanäytteen aktiivisuutta pisara-analyysissä lähes negatiivisen puskurikontrollin tasolle (kuva 15). His- tai muun vastaavan rakenteen lisäämisen sekvenssiin on osoitettu voivan aiheuttaa muutoksia entsyymiaktiivisuudessa, kun lisäksi on rakenteellisesti häirinnyt tai estänyt proteiinin sitoutumis- tai katalyyttisen yksikön toimintaa (Sabaty ym. 2013, Majorek ym. 2014, Yeon ym. 2014).

Deglykosylaatio PNGase F -amidaasientsyymillä pienensi *P. pastoris* -hiivassa tuotettujen kitinolyyttisten entsyymien kokoa. Kitinaasin (E7) kahdesta noin 28 ja 32 kDa:n proteiinista toinen pieneni 25 kDa:iin, toinen oli kooltaan 30-32 kDa (kuva 16c). His-hännällisen kitinaasin kaltaisen proteiinin (E8) koko pieneni noin 55 kDa:sta noin 45 kDa:iin (kuva 16b). His-hännättömän kitinaasin kaltaisen proteiinin tarkkaa kokoa ei voitu geeliltä määrittää tuottoalustaproteiinien liian suuren määrän ja vyöhykerajojen epätarkkuuden vuoksi, mutta deglykosylaation kokoon vaikuttava pieneneminen oli noin 10 kDa:n luokkaa (kuva 16c). Koska PNGase F -amidaasi ei katkaise ja poista oligosakkaridiosa proteiinista sisimmän *N*-asetyyli-glukosamiinin ja asparagiinin välistä silloin, jos *N*-asetyyli-glukosamiini on kytkeytynyt α -(1 \rightarrow 3)-fukoosiin, voivat proteiinit olla periaatteessa edelleen glykosyloituneita vielä deglykosylaatiokäsittelyn jälkeen etenkin, kun α -(1 \rightarrow 3)-fukoosin tiedetään olevan kasviproteiinien tyypillinen *N*-glykaanirakenne (Lerouge ym. 1998). *P. pastoris* -hiivan kyky translaation jälkeisiin muokkauksiin kuten glykosylaatioon on vaikuttanut sen suosioon eukaryoottisten proteiinien tuotto-organismina, koska *Pichian* ei katsota yliglykosyloivan proteiinia yhtä paljon kuin *Saccharomyces cerevisiae* -hiivan. Kuitenkin myös *Pichiassa* *N*-sidotut glykaanit usein ylimannosyloivat *Pichian* luontaisten glykosyylitransferaasien liittäessä *N*-glykaaneja asparagiiniin,

ja muokkausreaktioiden puutuessa ketjut pidentyvät. Tällöin ongelmia voivat aiheuttaa sekä kohdeproteiinin muuttuvat fysikaaliskemialliset piirteet sekä hiivaperäisten glykaanien ominaisuudet (Montesino ym. 1998, Li ym. 2007, Gmeiner ym. 2015). Koska kasveissa *N*-kytkeytyneet glykaanit vaikuttavat suuresti glykoproteiinin konformaatioon, stabiilisuuteen, liukoisuuteen ja biologiseen aktiivisuuteen ja voivat suojata sitä proteolyttiseltä hajoamiselta (Lerouge ym. 1998, Strasser 2016), on mahdollista, että *Pichia* tuottama glykosylaatio on proteiineille luontaisella tasolla, mutta yliglykosylaatio on myös voinut vaikuttaa kitinaasin kaltaisten proteiinien entsyymiaktiivisuustasoa heikentävästi.

6.3 Hiilihydraattimikrokalvoanalyysit

Kasvikitinaasit ovat indusoituneet stressitilanteiden lisäksi myös kehityksellisissä prosesseissa (Domon ym. 2000, van Hengel ym. 2002, von Arnold ym. 2005), ja kitinaasien kaltaisten geenien on osoitettu olleen välttämättömiä soluseinien ja johtosolukoiden kehityksessä ja vaikuttaneen ligniinin esiintymiseen (Zhong ym. 2002, Hossain ym. 2010, Sanchez-Rodriguez ym. 2012, Wu ym. 2012). Tämän vuoksi solunulkoista ligniiniä tuottavan kuusisolususpensioviljelmän alustan kitinaaseille sekä erityisesti puussa ilmenevälle kitinaasin kaltaiselle entsyymille etsittiin kuusiperäistä kitiinille vaihtoehtoista substraattia hiilihydraattimikrokalvomenetelmän avulla.

6.3.1 Kuusisolususpensioviljelmän alustaproteiinit (1. analyysi)

Hiilihydraattikalvomenetelmää on osoitettu voitavan soveltaa testattaessa entsyymiseosten ja viljelyalustojen entsyymiaktiivisuuksia yksittäisiä substraatteja kohtaan (Vidal-Melgosa ym. 2014), ja kuusisolususpensioviljelmän alustan totaaliproteiinit sisältäneessä konsentraatissa todettiin useita aktiivisia, pääasiassa hemiselluloosarakenteita pilkkovia entsyymejä. Kun entsyymi oli lisätty substraatille ennen pektiinien ja hemiselluloosan uuttoa, kuusisolujen ekstensiinirakenneproteiinin ja ksyloglukaanin, kehittyvän puun ksylaanin/arabinoksylaanin ja mannaanin sekä ligniinin ksylaanin/arabinoksylaanin havaittiin pilkkoutuneen (taulukko 8). Tällöin ksyloglukaani- ja mannaniivaste olivat selvästi muita voimakkaampia. Koska vastakiinnittynyt ekstensiini on ioni-

sidoksella kiinni happamissa polysakkarideissa ja uutettavissa suolalla kypsän ekstensiinin ollessa tiukasti kovalenttisella sidoksella kiinni soluseinässä ja uuttumaton (Fry 2000), on luontevaa, että ekstensiinivaste nähtiin vain solukkoviljelyssä kuusisolusubstraattissa natriumtetrahydroboraattia sisältäneen NaOH-uuton jälkeen. Ksyloglukaani on heinäkasveja lukuun ottamatta korkeampien kasvien pääasiallinen primääriseinän hemiselluloosatyyppi, jota havukasveilla on seinästä noin 10 % (Carpita ja Gibeaut 1993, Fry 2000, Ebringerova 2006), joten ksyloglukaanin hajoamista osoittaneet signaalit olivat voimakkaimpia sekundääriseinättömissä solukkoviljelyn soluissa. Glukuronoksyylaani on puuvartisten kasvien sekundaariseinien päähemiselluloosatyyppi, ja havupuiden ksylaanit ovat arabinosyloituneita (Ebringerova 2006, Busse-Wicher ym. 2016), minkä vuoksi kehittyvässä puussa todettiin kuusisoluviljelyalustan entsyymien vaikutuksesta arabinoksylaanien hajoamista (taulukko 8). On havaittu, että kuusen puukuiduista ei onnistuta eristämään täysin hiilihydraatitonta ligniiniä, vaan ligniini on niissä erityyppisissä ligniinihiilihydraattikomplekseissa (lignin-carbohydrate complex, LCC), joista ksylaani-ligniini-glukomannaani-LCC on määrältään yleisin (Lawoko 2005, Oinonen ym. 2015), mikä selittää ksylaanin läsnäolon kuusisolukkoviljelyn ligniinissä. Glukomannaani ja galaktoglukomannaani pienellä galaktoosisubstituutioasteella muodostavat pääosan havupuiden sekundäärisoluseinän hemiselluloosasta (Capek ym. 2000, Popper 2008, Fry 2011) mutta niitä tavataan myös primääriseinissä, minkä vuoksi mannaanien pilkkoutumista havaittiin kaikissa substraateissa ligniiniä lukuun ottamatta (taulukko 8). Lituruoholla mannaania on tavattu runsaasti varren puuosan paksuuntuneista soluseinistä ja tylppysolukosta, lehtien johtosolukoista ja myös sekä varren että lehtien päällysketon paksuuntuneista soluseinistä (Handford ym. 2003).

Kun entsyymi oli lisätty substraatin pektiineille ja hemiselluloosalle uuton jälkeen (koe 2), oli substraatin hajoamista osoittavien signaalien määrä ja taso huomattavasti alhaisempi kuin lisättäessä entsyymi substraatille ennen uuttoja (koe 1), vaikka joitakin samojen substraattien hajoamisreaktioita oli havaittavissa (taulukko 9). Ilmeisesti koeksessa 1 entsyymi pilkkoi substraattia jo homogenisoinnin aikana, ja hajonnut substraatti saattoi jopa osittain tai kokonaan siirtyä ennen pektiinien ja hemiselluloosan uuttovaihetta hylättävään supernatanttiin. Vaikka analyysin seuraavassa vaiheessa CDTA- tai NaOH-uutto olisi saattanut tutkittavat substraatin polysakkaridit liukoiseen

muotoon, ne olivat entsyymien esivaikutuksesta ehkä jo vähentyneet tai puuttuivat liuoksesta kokonaan. Jos substraatti puuttui kokonaan, vasta-ainemäärityksen tulos oli toisaalta kuitenkin sama kuin substraatin pilkkouduttua, eli vasta-aine ei sitoutunut ja signaalin arvo osoitti entsyymien pilkkoneen substraattia. Entsyymiä ja substraattia inkuboitiin keskenään 2 h entsyymilisäyksen jälkeen, mutta koska kokeet 1 ja 2 suoritettiin peräkkäin ja pipetoitiin samoille kuoppalevyille, kokeessa 1 entsyymi ja substraatti vuorovaikuttivat paljon pidemmän ajan, mikä on myös saattanut edesauttaa substraattien voimakkaampaa hajoamista. Vain kehittyvän puun kalloosin hajoaminen näkyi ainoastaan silloin, kun entsyymi oli lisätty substraatille NaOH-uuton jälkeen. Kalloosia tavataan jakaantuvien solujen solulevyissä, soluseinää vahvistavana materiaalina, patogeeniesteenä, sekä huokosten, ilmarakojen ja siivilälevyjen sulkija-aineena (Chen ja Kim 2009, Galatis ja Apostolakos 2010), joten ei ole yllättävää, että sitä todettiin kehittyvästä puusta, jossa solut jakaantuvat. Kun entsyymi lisättiin substraatille vasta uuton jälkeen, on entsyymillä käytössään olleen substraatin määrä voinut olla myös pienempi kuin ennen uuttoa, sillä uuttojen teho on vaihteleva eri substraatteihin, varsinkin pektiineihin. Vaikka kelatoiva CDTA uuttaa soluseinän kalsiumionit ja vaikuttaa kalsiumsiltoihin niin, että jotkin pektiiniset polysakkaridit muuttuvat asteittain liukoiseen muotoon, uuttoneiden pektiinien määrä voi vaihdella huomattavasti solutyypin välillä: vegetatiivisten solukoiden pektiineistä liukoiseksi saadaan 20–50 % mutta solukkoviljelmien pektiineistä vähemmän kuin 10 % (Fry 2000). Emäkset taas liuottavat hemiselluloosa-ainesta hyvin, mutta eri hemiselluloosatyyppit uuttuvat eri emäspitoisuuksilla. Käytetyn menetelmän NaOH-pitoisuus 4 M oli riittävä uuttamaan kattavasti soluseinän hemiselluloosan (Fry 2000).

6.3.2 Kuusisolususpensioviljelmän alustasta eristetyt kitinaasit (2. analyysi)

1. hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä kuusen solukkoviljelyalusta sisälsi useanlaisia entsyymejä, joilla todettiin aktiivisuutta moniin eri polysakkarideihin. Koska joukosta ei voitu tunnistaa kitinaasien entsyymiaktiivisuutta, viljelyalustasta puhdistettiin kitinolytisiä entsyymejä uutta hiilihydraattimikrokalvoanalyysia varten.

Kun kuusisolujen viljelyalustasta puhdistetut entsyymit oli lisätty substraatille ennen pektiinien ja hemiselluloosan uuttoa (koe 1), kaikki entsyymit aikaansaivat erityisesti kehittyvän mutta myös kypsän puun NaOH-uutettujen mannaanien pilkkoutumista kuten 1. analyysissäkin, mutta 1. analyysissä havaittua mannaanivastetta solukkoviljelmän kuusisoluille ei todettu (taulukko 10). Kitiinipylvääseen sitoutumattomat entsyymit, kahden puhdistetun kationisen kitinaasin seos sekä positiivinen kontrolli tuottivat arvoiltaan korkeimmat mannaanin hajoamista osoittavat signaalit, kun kitiinipylvään eluaatin signaaliarvo oli alhaisempi. Kitiinipylvääseen kiinnittymättömien proteiinien pitoisuus oli kaksinkertainen eluaattiin ja kymmenkertainen kationisten kitinaasien seokseen sekä positiiviseen kontrolliin nähden (taulukko 10), mutta pylvääseen kiinnittymättömien proteiinien joukossa on todennäköisesti voinut olla mannaaneja pilkkovia entsyymejä, joten tulos on ymmärrettävä. Sen sijaan kitiinipylvään eluaatin kationisia kitinaaseja alhaisempi vaste on odottamaton, koska eluaatin konsentraatio on suurempi, kationiset kitinaasit on jatkopuhdistettu eluaatista ja ne ovat eluaatin proteiinien kanssa samankokoisia SDS-PAGE -geelillä. On mahdollista, että eluaatti on sisältänyt huomattavan määrän samankokoisia anionisia entsyymejä, jotka eivät pilko mannaania ja joita ei ole onnistuttu eristämään ioninvaihtokromatografisesti. LM21-vasta-aine tunnistaa kasvisoluseinien β -sidotut mannaani-, glukomannaani- ja galaktomannaanipolysakkaridit sitoutuen tehokkaimmin 2–5 yksiköstä koostuviin β -(1 \rightarrow 4)-manno-oligosakkarideihin, LM22-vasta-aine tunnistaa mannaanit galaktomannaania lukuunottamatta (PlantProbes 2016) ja BS-400-4-vasta-aine tunnistaa lineaariset (1 \rightarrow 4)- β -manno-oligosakkaridit (1 \rightarrow 4)- β -mannaaneissa ja -galaktomannaaneissa (Biosupplies Australia 2016). Koska mannaanivaste esiintyy kaikissa neljässä laimennoksessa, molemmissa kerranteissa ja kaikilla mannaanivasta-aineilla, tulos vaikuttaa luotettavalta. Odottamatonta on positiivisen kontrollin (*S. griseuksen* kitinaasi) voimakas mannaanivaste (taulukko 10), jota ei havaittu lainkaan 1. hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä (taulukko 8), vaikka positiivisen kontrollin konsentraatio on molemmilla kerroilla ollut samaa luokkaa. Toisaalta *S. griseuksen* kitiiniä ja selluloosaa substraattinaan käyttävien lyyttisten polysakkaridimono-oksigenaasien on hiljattain osoitettu käyttävän substraattinaan myös hemiselluloosatyyppejä, erityisesti ksyloglukaania, hajottaen sen glukaanirunkoa (Agger ym. 2014). *S. griseus* tuottaa sekä kitinaasiryhmään 18 että 19 kuuluvia kitinaaseja, ja sen ryhmään 19 kuuluvien kitinaasien on todettu olevan rakenteeltaan luokan IV kasvikitinaasien kalta-

sia (Watanabe ym. 1999). Siksi ei liene aivan mahdotonta, että myös positiivinen kontrolli pilkkoi mannaania, mutta vasteen olisi pitänyt olla voimakkaampi myös 1. hiilihydraattimikrokalvoanalyysissa.

Ligniinin CDTA-uutetun metyloituneen homogalakturnaanirakenteen pilkkoutumista osoittavat signaaliarvot nähtiin kitiinipylvääseen sitoutumattomien proteiinien toimissa entsyyminä sekä kokeessa 1 että kokeessa 2, eli entsyymin lisäysajankohta ei vaikuttanut merkittävästi substraatin pilkkoutumiseen ja uuttotulokseen (taulukot 10 ja 11). Kitiinipylvääseen kiinnittymätön entsyymiseos sisälsi todennäköisesti myös pektiiniä hajottavia proteiineja, ja homogalakturnaanit ovat yleisiä havupuiden soluseinissä (Sarkar ym. 2009). 8 % kuusen puukuitujen ligniinistä on todettu tavattavan galaktoglukomannaani-ligniini-pektiini -yhdistelmä rakenteissa (Lawoko 2005), ja männyllä lignifikoituneissa solukoissa voimakkaasti metyloituneen homogalakturnaanin on havaittu olleen vähemmän metyloituneita hallitsevampi pektiinin muoto (Hafren ym. 2000). Tulos viittaa siihen, että kuusisolukkoviljelmän ligniiniin on sitoutunut pektiiniä.

Kun entsyymi oli lisätty substraatile uuttojen jälkeen kokeessa 2 (taulukko 11), oli mannaanin hajoamista osoittavien signaaliarvojen määrä ja taso alhaisempi kuin kokeessa 1 (taulukko 10) ja mannaanivaste tuli näkyviin vain ligniinisubstraatisa yhdellä vasta-aineella kolmesta (taulukko 11), mikä viittaa siihen, että entsyymin lisäys ennen NaOH-uuttoa tehosti mannaanisubstraatin hajoamista uuton jälkeiseen lisäämiseen verrattuna. Koe 2 tuotti lisäksi kitiinipylvään eluaatilta hienoista vastetta arabinogalaktaaniproteiineille (taulukko 11). Koska AGP:t ovat uutettavissa vedellä (Fry 2000), niiden tunnistus ensimmäisestä CDTA-uutetusta näytteestä oli odotettavaa, mutta koska signaali oli alhainen ja vain yhden AGP-vasta-aineen tulos kolmesta, ei substraatin pilkkoutuminen ole kovin todennäköistä. Toisaalta AGP:t ovat vesiuuttoisina saattaneet karata substraatista jo homogenisointivaiheen jälkeen supernatantin mukana myös negatiivisesta puskurikontrollista, jolloin niiden hajoamisreaktion tunnistaminen näytteen signaaliarvoa negatiiviseen kontrolliin suhteuttavalla vasta-ainereaktiolla ei onnistuisi luotettavasti.

2. hiilihydraattimikrokalvoanalyysissa mukana ollut entsyymien testaus niiden itsensä sisältämien polysakkaridien osalta osalta ilman substraattia ja uuttovaiheita osoitti kitinihelmikolonniin sitoutumattomien proteiinien (E6) sisältäneen useita pektiinisiä polysakkarideja sekä arabinogalaktaani- ja ekstensiinproteiineja (taulukko 12). Ilmeisesti kuusisolususpensioviljelmän alustakonsentraatti on ammoniumsulfaattisaostuksesta ja puskurinvaihdosta huolimatta sisältänyt vielä lukuisia viljelyalustan polysakkarideja. Toisaalta on outoa, etteivät monet pelkästä kitinihelmikolonniin sitoutumattomien proteiinien seoksesta osoitetuista polysakkarideista näy lainkaan substraattien (S1-S4) kanssa tehdyissä kokeissa (taulukot 10 ja 11). Arabinogalaktaani (JIM13), ekstensiini (JIM20) ja homogalakturnaanit (JIM18, JIM19) tuottavat kaikista voimakkaimmat vasta-ainesignaalit testattaessa pelkkää entsyymiä, mutta ne eivät näy hiilihydraattimikrokalvoanalyysin tuloksissa ollenkaan testattaessa entsyymiä substraatin kanssa. Myöskään arabinogalaktaani- (JIM8), arabinaani- (LM6) ja ekstensiini- (LM20) vasta-aineet eivät tuota polysakkaridin esiintymisestä ilmoittavaa signaaliarvoa, kun entsyymi on lisätty substraatille. Erityisesti arabinogalaktaaniproteiinit ovat saattaneet vesiuuttoisina huuhtoutua pois jo substraatti-entsyymiseoksen homogenointivaiheen jälkeen, mutta ehkä myös muut polysakkaridit ovat olleet entsyymiliuoksessa niin hienojakeisia, etteivät ne ole päätyneet homogenisointivaiheen jälkeen uutettavaan pellettiin. Periaatteessa glykosyloitunut proteiini voi sisältää myös glykaaniosassaan mannaania tai jotakin muuta polysakkaridia, ja esimerkiksi *S. cerevisiae*n endokitinaasi on todettu 18 % mannaanipitoista hiilihydraattia sisältäneeksi glykoproteiiniksi (Correa ym. 1982).

6.3.3 *Pichia pastoris* -hiivassa tuotetut kitinolyttiset entsyymit (3. analyysi)

Kun aiempien hiilihydraattimikrokalvoanalyysien perusteella näytti siltä, että solunulkoista ligniiniä tuottavan kuusisolususpensioviljelmän alustaan erittyneiden kitinaasien mahdollinen kuusiperäinen substraatti voisi olla mannaani, oli ajatuksena tuottaa kyseistä entsyymiä heterologisesti ja testata tuotos uudella hiilihydraattimikrokalvoanalyysillä. Näin pyrittiin varmistamaan, ettei aiemmin eristettyjen ja puhdistettujen kitinaasien ohella mannaaneille positiivisen vasteen antaneisiin analyysituloksiin voinut vaikuttaa jonkin muun entsyymien, kuten mannanaasin läsnäolo. Kitinaasin lisäksi rinnalle analysoitavaksi valittiin toinen erityisesti kuusen puuosassa ilmentyvä kitinaasin kaltainen proteiini.

Kun entsyymi lisättiin substraatille ennen pektiinien ja hemiselluloosan uuttoa (koe 1), kaikki entsyymit positiivinen kontrolli mukaanlukien aikaansaivat ksylaanin pilkkoutumista muissa substraateissa paitsi kehittyvässä puussa (taulukko 13). Solukkoviljelyyn kuusisolusubstraatin toinen kerranne ei pilkkoutunut minkään entsyymin vaikutuksesta, kun samanaikaisesti sen toinen kerranne tuotti samankaltaisia polysakkaridien hajoamisreaktioita kuin kypsä puu- ja ligniinisubstraatti. Kun sama kuusisolukerranne tuotti lisäksi lievän vasteen kaikilla entsyymeillä (1→3)(1→4)-β-D-glukaanille (taulukko 13), jota tavataan vain ruohoilla, heinillä ja kortteilla (Fry ym. 2008, Sørensen ja Willats 2008), voidaan kyseistä kerrannetta pitää epäluotettavana ja jättää se huomioimatta. Ksylaanivaste pelkästään kypsässä puussa ja ligniinissä oli perusteltu, sillä ksylaani on yleinen hemiselluloosatyyppi puuvartisten kasvien sekundääriseinissä (Busse-Wicher ym. 2016). Odottamatonta oli sen sijaan tasaisesti yhtä voimakas ksylaanivaste kaikilla entsyymeillä, myös positiivisena kontrollina toimineella bakteerikitinaasilla (taulukko 13), kun entsyymien itsensä ei kuitenkaan todettu sisältäneen ksylaania (taulukko 15). Käytettyjen entsyymien pitoisuudet olivat toisiinsa nähden hyvin erilaiset. Kitiinipylvään kitinaasieluaatin pitoisuus oli 20–30 kertaa ja metalli-ioni-affiniteettikromatografialla puhdistetun kitinaasin kaltaisen proteiinin pitoisuus 2–3 kertaa muiden entsyymien pitoisuutta pienempi (taulukko 5), joten eron olisi odottanut näkyvän myös hiilihydraattimikrokalvoanalyysin positiivisten signaalien arvoissa. Hiilihydraattimikrokalvomenetelmän on osoitettu tunnistavan (eli signaalin arvo on ollut suurempi kuin 1) endo-1,3-glukanaasi-, ksyloglukanaasi-, sellulaasi- ja endo-1,4-mannanaasientsyymiaktiivisuutta BS-400-3-, LM15-, CBM3a- ja LM21-epitoopeilla vielä käytettäessä 0,007, 0,0009, 0,007 ja 0,002 µg/ml:n entsyymikonsentraatioita tässä järjestyksessä, ja substraattimäärän pienentämisen kuudestoistaosaan vaikuttavan jopa 100 kertaa detektiorajaa alentavasti ksyloglukanaasilla sekä polygalakturonaasilla (Vidal-Melgosa ym. 2014). Hiilihydraattimikrokalvoanalyysissa 3 käytettiin entsyymipitoisuuksia 7,5–328 µg/ml, joten ne olivat selvästi esimerkkientsyymien määritysrajoja suurempia. Kun entsyymeinä toimivat luonteeltaan ja odotetulta aktiivisuudeltaan erityyppiset proteiinit, kasvikitinaasi, kitinaasin kaltainen proteiini, *Pichian* tuottoalustan totaaliproteiiniseos, joka sisälsi *Pichian* omia entsyymejä, sekä bakteerikitinaasi, analyysitulosten ei olisi odottanut myöskään olleen niin toistensa kaltaisia. Koska 3. hiilihydraattimikrokalvoanalyysissa ksylaanin hajoamista ilmaisseet signaaliarvot tulivat esiin vain yhdellä ksylaanivasta-ai-

neella kolmesta (taulukko 13), on tulos epäluotettavampi kuin 2. hiilihydraattimikrokalvoanalyysin mannaanin kohdalla, jolloin mannaanivaste todettiin kaikilla kolmella mannaanivasta-aineella (taulukko 10). 3. hiilihydraattimikrokalvoanalyysin ksylaanivaste todettiin LM10-ksylaanivasta-aineella, joka tunnistaa substituomattomat ja vähän substituoidut ksylaanit. LM11-ksylaani/arabinoksylaanivasta-aine tunnistaa edellisen lisäksi laajemman ksylaanitukitrangan substituution ja LM23-ksylosyylivasta-aine tunnistaa asetyloimattomat ksylosyyliketjut sekä pektiiniset ksylogalakturnaanin ja ksylaanin (PlantProbes 2016). Siksi luotettavassa vasteessa kaikkien kolmen vasta-aineen olisi odottanut tuottavan positiivisen signaaliarvon.

Kokeessa 1 havaittua johdonmukaista vastetta ksylaanille ei nähdä lainkaan kokeessa 2, kun entsyymi lisättiin substraatile uuttojen jälkeen (taulukko 14), mikä voi viitata siihen, että entsyymien lisäys ennen uuttoa tehosti oleellisesti substraatin hajoamista tai myös siihen, että ksylaanivaste ei ole todellinen. Kahdesta aiemmasta mikrokalvoanalyysistä poiketen koe 2 suoritettiin vasta vuorokauden kuluttua kokeesta 1 uuttoluostien ollessa pakastettuna yön yli, mikä on myös tarjonnut kokeen 1 entsyymeille enemmän hajotusaikaa kokeeseen 2 verrattuna. Kitinaasin kaltaisen proteiinin tuottoalustan aikaansaamat kalloosin pilkkoutumista osoittavat signaaliarvot NaOH-uutetussa kehittyvässä puussa (taulukko 14) ovat lähtöisin alustan totaaliproteiineista, joista useat voivat olla peräisin tuottoisännästä. Erityisesti kuusisolujen CDTA-uutetut arabinogalaktaaniproteiinit näyttivät pilkkoutuneen positiivisena kontrollina toimineen bakteerikitinaasin vaikutuksesta (taulukko 14), mitä ei kuitenkaan ole todettu aiemmilla analyysikerroilla (taulukot 9 ja 11), kun sama positiivinen kontrolli on ollut käytössä.

3. hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä mukana ollut entsyymien testaus niiden itsensä sisältämien polysakkaridien osalta ilman substraattia ja uuttovaiheita ei osoittanut polysakkarideja yhdestäkään entsyymistä, mutta tunnistoi pelkästä negatiivisesta puskuri-kontrollista mannaania ja ksyloglukaania (taulukko 15). Tunnistus tapahtui kahdella mannaanivasta-aineella (BS-400-4, LM21) ja yhdellä ksyloglukaanivasta-aineella (LM25) kolmesta, mutta kaikissa tapauksissa vain toisessa kerranteessa. Siksi todennäköisyys puskurin sisältämille polysakkarideille on pieni ja kyse lienee epäspesifisestä reaktiosta. Toisaalta koska mannaanivastetta havaittiin myös kitinaasisubstraatin (E7) ja positiivisen

kontrollin (PK) kera vain toisessa kerranteessa (taulukko 14), ei voida täysin varmasti sulkea pois mahdollista polysakkaridikontaminaatiota puskuriliuoksessa.

3. hiilihydraattimikrokalvoanalyysi tuotti odottamattomia, epäloogisia ja ristiriitaisia tuloksia. Tasainen ksylaanin hajoaminen kaikissa substraateissa kehittyvää puuta lukuun ottamatta kaikilla entsyymeillä vain yhden vasta-aineen tunnistamana kolmesta ja kuusisolusubstraatissa vain toisessa kerranteessa (taulukko 13) vaikuttaa oudolta. Myös puskuriliuoksen mannaanit kahden vasta-aineen tunnistamana kolmesta ja ksylaani yhden vasta-aineen tunnistamana kolmesta vain toisessa kerranteessa (taulukko 15) ovat seikkoja, joita on vaikea selittää ja jotka nakertavat koko 3. hiilihydraattimikrokalvoanalyysin luotettavuutta.

6.3.4 Hiilihydraattimikrokalvoanalyysikertojen keskinäinen vertailu

Kolmella hiilihydraattimikrokalvoanalyysikerralla analysoitiin kahdessa eri järjestyksessä käsiteltyjä näytteitä. Tutkituille kuusientsyymeille tuntui jokaisella analyysikerralla toimivan tehokkaammin entsyymin lisääminen substraatile ennen substraatin pektiinien ja hemiselluloosan uuttamista CDTA:lla ja NaOH:lla kuin se, että entsyymi lisättiin pilkkomaan jo uutettuja substraattiaineita, sillä substraatin hajoamista osoittavien signaalinarvojen määrä ja taso oli näin aina suurempi ja vain muutama pilkkoutumistulos havaittiin pelkästään silloin, kun entsyymin lisäys oli tapahtunut uuttojen jälkeen. Jo valmiiksi liukoiksi uutetuissa substraattirakenteissa ei ehkä ollut enää jäljellä tai esillä hiilihydraatteja tai sidoksia, joita kitinolyttiset entsyymit pystyivät pilkkomaan, tai olot entsyymin toiminnalle uuton jälkeen eivät olleet ihanteelliset. Sen sijaan kun entsyymi toimi ensin käsittelemättömässä alkuperäisessä substraatissa, uuttokäsittelyt erottivat pilkkoutuneet rakenneosat tunnistettaviksi. Pilkkoutuneet substraattirakenteet sekä vesiuuttoiset arabinogalaktaaniproteiinit olivat myös voineet jäädä homogenisoinnin jälkeen supernatanttiin ja poistua analyysistä ennen uuttoja, jolloin vasta-aine ei sitoutunut substraattiin. Vaikka vasta-aine on kykenemätön sitoutumaan sekä silloin, kun substraattia ei ole, että silloin, kun substraatti on pilkkoutunut, signaalien arvot eivät näissä tapauksissa kuitenkaan liene täysin toisiaan vastaavat pilkkoutumistasojen vaihdellessa. Kun entsyymi lisättiin substraatile ennen pektiinien ja hemiselluloosan uuttoja,

jäi sen vaikutusaika myös pidemmäksi kuin silloin, kun entsyymi lisättiin substraatile uuttojen jälkeen, mikä todennäköisesti lisäsi substraatin hajoamisastetta.

Se, että positiivisena kontrollina toimineen *S. griseus* -bakteerikitinaasin pitoisuus oli likimain sama ja riittävä kaikissa kolmessa hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä (taulukko 5), mutta substraatin pilkkoutumista ilmaisseet vasteet kohdistuivat eri analyysikerroilla eri substraatteihin, kyseenalaistaa koko hiilihydraattimikrokalvoanalyysin luotettavuutta. 1. analyysissä positiivinen kontrolli tuotti vain hajanaisia signaaliarvon 2 vasteita (taulukot 8 ja 9). 2. analyysissä positiivinen kontrolli näytti hajottaneen kehittyvän puun mannaaneja molemmissa kerranteissa hyvin säännönmukaisesti kaikilla kolmella mannaanivasta-aineella signaaliarvoilla 3–8 kuten muutkin kuusen omat entsyymit (taulukko 10). 3. analyysissä yksi ksylaanivasta-aine kolmesta osoitti positiivisen kontrollin pilkkoneen kypsän puun ja ligniinin ksylaania signaaliarvoilla 2–3 kuten muutkin *Pichiassa* tuotetut entsyymit (taulukko 13). Lisäksi muista entsyymeistä poiketen yksi AGP-vasta-aine kolmesta tunnisti positiivisen kontrollin hajottaneen kuusisolujen ja kehittyvän puun arabinogalaktaaniproteiineja signaaliarvoilla 2–5 (taulukko 14). Positiivisen kontrollin valmistamisessa kolmeen eri hiilihydraattimikrokalvoanalyysiin oli tapahtunut joka kerralla lieviä poikkeamia, mikä on voinut vaikuttaa tuloksien hajontaan. Ensimmäisissä analyyseissä kylmäkuivattu entsyymi ei liuennut hyvin puskuriliuokseen, ja siksi 2. analyysissä seosta oli lämmitetty 40 °C:ssa ennen lisäystä substraatile, mikä on voinut edistää entsyymiaktiivisuutta. 3. analyysissä positiivinen kontrolli valmistettiin ennalta liuotetusta ja kolmeksi vuodeksi -80 °C:ssa pakastetusta entsyymistä. Jos entsyymivalmiste on herkkä esitetyn kaltaisille poikkeamille, on mahdollista, että positiivinen kontrolli toimi heikosti 1. hiilihydraattimikrokalvoanalyysissä huonon liukenemisen vuoksi ja 3. analyysissä liian pitkän pakastuskauden takia. 2. analyysin kaikilla kolmella mannaanivasta-aineella todettu mannaanivaste saattaisi olla todellinen, koska se ei eronnut kuusientsyymeistä (taulukko 10) ja koska 3. analyysin ksylaani- ja AGP-vasteet todettiin vain yhdellä vasta-aineella kolmesta (taulukot 13 ja 14).

Hiilihydraattimikrokalvoanalyysin toistettavuus on kokeissa osoitettu varsin hyväksi. Selitysaste (korrelaatiokertoimen R^2 -arvo) on ollut yli 0,97, kun on ollut kyse teknisestä vaihtelusta saman analyysin sisällä, ja yli 0,90 eli hieman heikompi, kun on toistettu erilisiä kokeita. Heikomman arvon on katsottu syntyneen pienistä eroista substraattien ja

entsyymien tilassa, kalvolle siirtämisessä, vasta-ainekäsittelyssä ja kehityksessä (Vidal-Melgosa ym. 2014), mikä on mahdollisesti tullut myös näkyviin nyt, kun analyysit suoritettiin kolmessa osassa ja alhaisia tason 2 signaaliarvoja on esiintynyt paljon. Kaksi ensimmäistä hiilihydraattimikrokalvoanalyysia suoritettiin välivaiheiden tuotteita pakastamatta suoraan kahdessa päivässä, kun taas 3. analyysi tehtiin niin, että uuttoliuokset pakastettiin yhdeksi yöksi ennen koetta 2 ja hiilihydraattimikrokalvoille siirretyt näytteet odottivat vasta-ainekäsittelyä kaksi viikkoa. Analyysiin käytetty lisäaika sekä pakastaminen ja sulattaminen ovat saattaneet muuttaa entsyymien ja substraattien käyttäytymistä kahteen ensimmäiseen hiilihydraattimikrokalvoanalyysiin verrattuna.

Koska jo 1. hiilihydraattimikrokalvoanalyysissa sekä (1→4)-β-D-galaktoglukomannaanin että (1→4)-β-D-glukomannaanin vasta-aineilla todettu kuusisoluviljelyalustan entsyymien aikaansaama voimakas mannaanien pilkkoutuminen vahvistui 2. analyysissa käytettäessä alustasta eristettyjä, puhdistettuja kitinaaseja ja kolmatta (1→4)-mannanivasta-ainetta (taulukko 10), mannaanien toimiminen kuusikitinaasien substraattina on todennäköistä. Tätä tukee myös 2. analyysin kationisen kitinaasiseoksen jatkoanalysointi anioninvaihto- ja ohutkerroskromatografialla (Sanna Koutaniemi, Helsingin yliopisto, sähköpostiviesti kirjoittajalle 18.11.2013). Tulos viittasi entsyymien vapauttaneen oligosakkarideja luontaisesti asetyloidusta sekä deasetyloidusta kuusen galaktoglukomannaanista ja konjac-glukomannaanista mutta ei guar-galaktomannaanista. Näissä kokeissa positiivisena kontrollina toiminut bakteerikitinaasi oli peräisin samasta erästä kuin 3. hiilihydraattimikrokalvoanalyysissa mutta kaksi vuotta tuoreempaa eikä se reagoanut lainkaan substraatteja hajottavasti. Koska galaktomannaanilla on muista substraateista poiketen mannoosirunko ja korkea substituutioaste eikä se ole yleinen kuusisolukoissa (Mulimani ja Prashanth 2002), kuusikitinaasit eivät ehkä kyenneet sitä hajottamaan. 3. hiilihydraattimikrokalvoanalyysin tulokset heterologisesti tuotetuilla kitinolyttisillä entsyymeillä, joista yksi vastasi todennäköisesti kuusisoluviljelmän alustasta eristettyä entsyymiä, eivät tukeneet mannaanisubstraattiajatus (taulukko 13), mutta ylimääräiset deglykosylaatiot ja His-tagin lisäys entsyymirakenteisiin ovat saattaneet vaikuttaa aktiivisuutta alentavasti. Vaikka galaktoglukomannaaneita esiintyy runsain määrin havupuiden sekundääriseinissä, niitä on tunnistettu myös monista primäärisolukoista, jopa tupakan solukkoviljelmien alustaan erittäminä, ja niiden on arveltu

osallistuvan kasvisolujen säätelyprosesseihin (Sims ym. 1997, Capek ym. 2000). Galaktoglukomannaanioligosakkaridilisäyksen viljelyalustaan on todettu edistäneen kuusen alkioiden kehitystä (Liskova ym. 1995). Kakoniova ym. (2010) ovat havainneet kuusen sekundääriseinästä eristettyjen galaktoglukomannaanioligosakkaridien lisäämisen kuusikallussoluista peräisin olleeseen protoplastiviljelmään edistäneen merkittävästi protoplastien elinkykyisyyttä. Tällöin protoplastien soluseinien uusiutumisen aikana solut ovat erittäneet viljelyalustaan sekä oligo- ja polysakkarideja että hydrolyyttisiä entsyymejä kuten kitinaaseja ja glukanaaseja, mikä voisi viitata substraatti-entsyymi-vuorovaikutussyhteyteen kitinaasien ja galaktoglukomannaanien välillä. Lituruohon *AtCSLA7*-geenin on osoitettu koodaavan mannaanisyntaasia mutta vastaavan mutantin, jossa geenituotetta ei synny, tuottaneen elinkyvyttömiä alkioita, mikä antaa myös viitteitä mannaanilla olevan merkitystä alkionkehityksessä (Goubet ym. 2003, Liepman ym. 2005). Benova-Kakosova ym. (2006) ovat havainneet puusoluja muodostavaan isotsinniaiviljelmään (*Zinnia elegans*) lisättyjen kuusen puun galaktoglukomannaanioligosakkaridien kasvattaneen viljelmän solutiheyttä ja pienentäneen putkilosolujen protoksyleemi/metaksyleemi-suhdetta. Tällöin glukomannaanit ovat kerääntyneet merkittävästi viljelyalustaan ja erilaistumisvaiheessa olevien puusolujen soluseiniin, mikä viittaa mannaanien esiintyvän luontaisesti johtosolukon erilaistumiseen liittyvässä signaaloinnissa. Galaktoglukomannaanit ovat myös toimineet aukiinin vastavaikuttajana vähentäen luontaisen aukiinin, indolietikkahapon vaikutusta lituruohon juurten kasvuun ja myös aukiinikuljetukseen liittyvien säätelijöiden, flavonoidien kerääntymistä kasvupisteeseen ja pidentymisvyöhykkeelle (Kucerova ym. 2016).

Kitinaasin kaltaisen proteiinin ei odotettu toimivan sen rinnalla analysoidun kitinaasin tavoin vaan ennemmin erottuvan siitä. 3. hiilihydraattimikrokalvoanalyysin kitinaasin ja kitinaasin kaltaisen proteiinin voimakkain yhdenmukainen vaste ksylaanisubstraatille (taulukko 13) ei ollut riittävän luotettava testattujen entsyymien keskinäisten eroavaisuuksien ja kahden ksylaanivasta-ainetunnistuksen puuttumisen vuoksi. Viljelmän kitinaasi- tai *CTL*-geenien ilmenemisen kytköksestä kuusisolulinjan ulkopuolisen ligniinin tuotantoon ei saatu viitteitä. Vaikka mannaanit saattaisivat olla substraattivaihtoehto kuusisolukkoviljelmän kitinaaseille, kitinaasien kaltaisilla entsyymeillä on todennäköisesti eri substraatti, josta nyt ei saatu havaintoja, eivätkä mannaanit, kitinaasit ja so-

lunulkoinen ligniini välttämättä liity toisiinsa. Tosin kuusen ligniinin on tutkittu ristosito-
van kovalenttisesti kaksi havupuiden päähemiselluloosatyyppiä, ksylaaniin ja galakto-
glukomannaaniin, fenyyli- ja bentsyylieetterisidoksin verkostoiksi niin, että lig-
niini toimii siltana hemiselluloosatyypien välillä (Lawoko ym. 2006, Teleman 2009, La-
woko 2013, Giummarella ym. 2016). Oinonen ym. (2015) ovat ehdottaneet hemisellu-
loosa-ligniini -kompleksien muodostavan kovalenttisesti sitoutuneita rakenneyksiköitä
lignifikaation varhaisvaiheessa. Erityisesti kitinaasien kaltaisten proteiinien on rapor-
toitu vaikuttaneen soluseinän muodostumiseen, selluloosan rakenteeseen ja ligniinin
esiintymiseen, ja lituruohon *AtCTL1*- ja *AtCTL2*-geenien toiminnan merkitys ligniinin
esiintymisessä on varmistunut (Johnston 2001, Zhong ym. 2002, Zhang ym. 2004, Hos-
sain ym. 2010, Wu ym. 2012, Mokshina ym. 2014). Kun kolmea lituruohon ektooppista
lignifikaatiota aiheuttavaa eri geeneistä peräisin ollutta knock-out -mutanttia ja villityyp-
piä on verrattu keskenään, *Atctl1*-mutantilla on ollut soluseinän arabinoosin ja fukoosin
määrä sekä ligniinin syringyyli/guaiasylyliyksikköjen suhde selvästi villityyppiä korkeampi
ja ramnoosin määrä matalampi ja kokonaisligniinipitoisuus sama kuin villityypillä. Huo-
mattava yhtäläisyys mutanttien välillä on ollut ektooppisen ligniinin sijainti varren yti-
messä ja satunnaisesti nilan kuiduissa (Rogers ym. 2005). *AtCTL1* ja -2-geenien arvellaan
säätelevän myös selluloosan sijoittumista ja vuorovaikutusta hemiselluloosan kanssa si-
toutumalla syntyviin selluloosamikrofibrilleihin (Sanchez-Rodriguez ym. 2012). Molem-
milta *AtCTL*-proteiineilta tiedetään puuttuvan kitiinin sitomiseen ja kitinolyyttiselle ak-
tiivisuudelle tarvittavat aminohapot (Zhang ym. 2004), mutta proteiinien on todettu si-
toutuvan glukaanipohjaisiin polymeereihin *in vitro*. Kun Sanchez-Rodriguez ym. (2012)
ovat tutkineet *AtCTL*-proteiinien sitoutumista eri substraatteihin, ne ovat sitoutuneet
selkeästi voimakkaimmin puhtaaseen ksyloglukaaniin sekä lituruohon taimien solusei-
näfraktioihin, joiden päähemiselluloosana on ksyloglukaani. Sitoutumista on tapahtunut
jonkin verran myös selluloosaan, kitiiniin ja kitosaaniin mutta ei lainkaan pektiineihin,
arabinogalaktaaniproteiiniin tai ksylaaniin mannaanien puuttuessa kokeesta. Ksylo-
glukaania esiintyy todennäköisesti kaikkien putkilokasvien primäärisoluseinissä (Popper
ja Fry 2004), ja se muodostaa selluloosakuitujen kanssa verkostoja, joiden olet-
etaan säätelevän soluseinän löysyyttä ja solun muotoa (Carpita ja Gibeau 1993, Hsieh ja
Harris 2012, McCann ja Knox 2012). Koska lituruohon kitinaasin kaltaisten proteiinien
oletetaan osallistuvan selluloosan ja hemiselluloosan vuorovaikutukseen selluloosakui-
tuihin sitoutuen (Sanchez-Rodriguez ym. 2012) ja lisäksi riisin CTL-proteiinin vaikuttavan

selluloosan biosynteesiin, soluseinän mekaaniseen kestävyyteen ja muokkaukseen (Wu ym. 2012 ja 2013), on mahdollista, että ksyloglukaani toimisi substraattina myös kuusen kitinaasien kaltaisille proteiineille.

7 Johtopäätökset

Tutkielma ei vielä sulje pois vaihtoehtoa, että tutkimusmateriaalina olleen kuusisoluviljelmän viljelyalustaan erittyneet kitinaasit toimisivat patogeenikitiinin lisäksi myös jollakin kuusen omalla hiilihydraattisubstraatilla, vaikka saadut tulokset eivät paljastaneet selkeää substraattikandidaattia. Valitun heterologisen tuottomenetelmän haittapuolena oli *Pichian* tuottamien ylimääräisten glykosylaatioiden vaikutus proteiinien ominaisuuksiin sekä toimivan puhdistusmenetelmän puute lopputuotteille, mikä vaikeutti kitinolyyttisten entsyymien ominaisuuksien tarkastelua.

Jotta saataisiin varmuus mannaanien toimimisesta tai toimimattomuudesta kitinaasisubstraattina, olisi kitinaasia tuotettava *P. pastoris* -hiivassa uudelleen ilman Histag -rakennetta tai siirryttävä kokeilemaan kasviperäistä tuottoisäntää. Affiniteetti- ja kationinvaihtokromatografisen puhdistuksen jälkeen kitinaasi olisi vielä testattava hiilihydraattimikrokalvoanalyysillä kaikilla kolmella mannaanivasta-aineella. Puhdistettujen kitinaasien substraattivaihtoehtoja kuten mannaania voitaisiin testata myös kromogeenisin substraatein tai uudelleen anioninvaihto- ja ohutkerroskromatografialla, koska hiilihydraattimikrokalvoanalyysin toistettavuus ei vaikuttanut kovin varmalta. Kitinaasin kaltaiselle proteiinille olisi löydettävä *Pichiaa* sopivampi yliglykosyloimaton tuottoisäntä sekä puhdistusmenetelmä, jossa proteiinien yhteenliittyminen voidaan välttää, ennen kuin sen substraattivaihtoehtojen testaus hiilihydraattimikrokalvoanalyysillä onnistuu. Viitteitä saatiin kuitenkin siitä, että sekä kuusisolukkoiljelmän kitinaasit että kuusi-kitinaasien kaltaiset proteiinit osallistuvat johonkin kuusisolukon kehitykselliseen toimintoon jokin kuusiperäinen polysakkaridi substraattinaan.

Kiitokset

Kiitän ohjaajaani dosentti Anna Kärköstä mielenkiintoisesta työn aiheesta sekä arvokkaista neuvoista ja jatkuvasta tuesta työn aikana. Kiitän myös professori William G. T. Willatsia (University of Copenhagen, Faculty of Science, Department of Plant and Environmental Sciences, Section of Plant Glycobiology) mahdollisuudesta työskennellä hänen laboratoriossaan testatakseni kitinaasinäytteet heidän tutkimusryhmänsä kehittämällä hiilihydraattimikrokalvomenetelmällä ja tohtori Julia Schückelia ja tohtori Silvia Vidal-Melgosaa opastuksesta, asiantuntemuksesta ja näytteiden analysoinnista hiilihydraattikalvomenetelmällä. Lisäksi kiitän tohtori Sanna Koutaniemeä näytteiden kromatografisesta jatkoanalysoinnista, molekyylibiologian teknikko Arezoo Zamania (Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Pacific Forestry Center, Victoria) kitinaasivasta-aineiden toimittamisesta sekä Niemi-säätiötä apurahasta kitinaasitutkimukseen.

Lähteet

- Adrangi, S. & Faramarzi, M. 2013. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnology Advances* 31 (8): 1786–1785.
- Agger, J., Isaksen, T., Varnai, A., Vidal-Melgosa, S., Willats, W., Ludwig, R., Horn, S., Eijsink, V. & Westereng, B. 2014 Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. *Proceedings of National Academy of Sciences* 111 (17): 6287-6292.
- Anitha, A., Sowmya, S., Kumar, P., Deepthi, S., Chennazhi, K., Erlich, H., Tsurkan, M. & Jayakumar, R. 2014. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 39 (9): 1644-1667.
- Arnold, S. von, Bozhkov, P., Clapham, D., Dyachok, J., Filonova, L., Hogberg, K., Ingouff, M. & Wiveger, M. 2005. Propagation of Norway spruce via somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81 (3): 323-329.
- Atkins, E. 1985. Conformations in polysaccharides and complex carbohydrates. *Journal of Biosciences* 8 (1-2): 375-387.
- Bargagli, E., Margollicci, M., Nikiforakis, N., Luddi, A., Perrone, A., Grosso, S. & Rottoli, P. 2007. Chitotriosidase activity in the serum of patients with sarcoidosis and pulmonary tuberculosis. *Respiration* 74 (5): 548-552.
- Barthomeuf, C., Regerat, F. & Pourrat, H. 1994. Improvement in tannase recovery using enzymatic disruption of mycelium in combination with reverse micellar enzyme extraction. *Biotechnololy Techniques* 8 (2): 137-142.
- Benova-Kakosova, A., Digonnet, C., Goubet, F., Ranocha, P., Jauneau, A., Åesquet, E., Barbier, O., Zhang, Z. , Capek, P., Dupree, P., Liskova, D. & Goffner, D. 2006 Galactoglucomannans increase cell population density and alter the protoxylem/metaxylem tracheary element ratio in xylogenic cultures of zinnia. *Plant Physiology* 142 (2): 696-709.
- Biosupplies Australia Pty Ltd. 2016. Monoclonal antibody to (1→4)-β-mannan and galacto-(1→4)-β-mannan. <http://www.biosupplies.com.au/docs/400-4.pdf>. Viitattu 01.09.2016.
- Bishop, J., Dean, A. & Mitchell-Olds, T. 2000. Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection plant-pathogen coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (10): 5322-5327.

- Blum, H., Beier, H. & Gross, H. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8 (2): 93-99.
- Bonanomi, A., Wiemken, A., Boller, T. & Salzer, P. 2001. Local induction of a mycorrhiza-specific class III chitinase gene in cortical root cells of *Medicago truncatula* containing developing or mature arbuscules. *Plant Biology* 3 (2): 194-200.
- Brotman, Y., Landau, U., Pnini, S., Lisec, J., Balazadeh, S., Mueller-Roeber, B., Zilberstein, A., Willmitzer, L., Chet, I. & Viterbo, A. 2012. The LysM receptor-like kinase LysM RLK1 is required to activate defense and abiotic-stress responses induced by overexpression of fungal chitinases in *Arabidopsis* plants. *Molecular Plant* 5 (5): 1113-1124.
- Brunner, F., Stintzi, A., Fritig, B. & Legrand, M. 1998. Substrate specificities of tobacco chitinases. *The Plant Journal* 14 (2): 225-234.
- Brunow, G., Kilpeläinen, I., Lapierre, C., Lundquist, K., Simola, L. & Lemmetyinen, J. 1993. The chemical structure of extracellular lignin released by cultures of *Picea abies*. *Phytochemistry* 32 (4): 845-850.
- Busse-Wicher, M., Li, A., Silveira, R., Pereira, C., Tryfona, T., Gomes, T., Skaf, M. & Dupree, P. 2016. Evolution of xylan substitution patterns in gymnosperms and angiosperms: Implications for xylan interaction with cellulose. *Plant Physiology* 171 (4): 2418-2431.
- Buuren, M. van, Neuhaus, J.-M., Shinshi, H., Ryals, J. & Meins, F. 1992. The structure and regulation of homeologous tobacco endochitinase genes of *Nicotiana sylvestris* and *N. tomentosiformis* origin. *Molecular & General Genetics* 232 (3): 460-469.
- Capek, P., Kubackova, M., Alföldi, J., Bilisics, L. Liskova, D. & Kakoniova, D. 2000. Galactoglucomannan from the secondary cell wall of *Picea abies* L. Karst. *Carbohydrate Research* 329 (3): 635-645.
- Carpita, N. & Gibeaut, D. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* 3 (1): 1-30.
- Cesar, S. & Ignacimuthu, S. 2012. Genetic engineering of crop plants for fungal resistance: Role of antifungal genes. *Biotechnology Letters* 34 (6): 994-1002.
- Chavan, S. & Deshpande, M. 2013. Chitinolytic enzymes: An appraisal as a product of commercial potential. *Biotechnology Progress* 29 (4): 833-846.

- Chen, H., Gonzales-Vigil, E. & Howe, G. 2008 Action of plant defensive enzymes in the insect midgut. Teoksessa: Schaller, A. (toim.) Induced plant resistance to herbivory. Alankomaat: Springer Publishing Co. s. 271-284.
- Chen, X.-Y. & Kim, J.-Y. 2009. Callose synthesis in higher plants. *Plant Signaling and Behavior* 4 (6): 489-492.
- Cletus, J., Balasubramanian, V., Vashisht, D. & Sakthivel, N. 2013. Transgenic expression of plant chitinases to enhance disease resistance. *Biotechnology Letters* 35 (11): 1719-1732.
- Collinge, D., Kragh, K., Mikkelsen, J., Nielsen, K., Rasmussen, U. & Vad, K. 1993. Plant chitinases. *The Plant Journal* 3 (1): 31-40.
- Correa, J., Narayasanamy, E., Polacheck, I. & Cabib, E. 1982. Endochitinase, a mannan-associated enzyme of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 257 (3): 1392-1397.
- Day, B., Okada, M., Ito, Y., Tsukada, K., Zaghouani, H., Shibuya, N. & Stacey, G. 2001. Binding site for chitin oligosaccharides in the soybean plasma membrane. *Plant Physiology* 126 (3): 1162-1173.
- Ding, X., Luo, Z., Xia, L., Gao, B., Sun, Y. & Zhang, Y. 2008. Improving the insecticidal activity by expression of a recombinant *cry1Ac* gene with chitinase-encoding gene in acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis*. *Current Microbiology* 56 (5): 442-446.
- Domon, J., Neutelings, G., Roger, D., David, L. & David, H. 2000. A basic chitinase-like protein secreted by embryogenic tissues of *Pinus caribea* acts on arabinogalactan proteins extracted from the same cell lines. *Journal of Plant Physiology* 156 (1): 33-39.
- Dong, J.-Z. & Dunstan, D. Plant endochitinase and β -1,3-glucanase genes are developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. 1997. *Planta* 201: 189-194.
- Dyachok, J., Wiveger, M., Kenne, L. & von Arnold, S. 2002. Endogenous nod-factor-like signal molecules promote early somatic embryo development in Norway spruce. *Plant Physiology* 128 (2): 523-533.
- Ebringerova, A. 2006. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromolecular Symposia* 232 (1): 1-12.

- Egertsdotter, U. & von Arnold, S. 1998. Development of somatic embryos of Norway spruce. *Journal of Experimental Botany* 49 (319): 155-162.
- Eijsink, V., Vaaje-Kolstad, G., Vårum, K. & Horn, S. 2008. Towards new enzymes for bio-fuels: lessons from chitinase research. *Trends in Biotechnology* 26 (5): 228-235.
- Fossdal, C., Hietala, A., Kvaalen, H. & Solheim, H. 2006. Changes in host chitinase isoforms in relation to wounding and colonization by *Heterobasidion annosum*: Early and strong defense response in 33-year-old resistant Norway spruce clone. *Tree Physiology* 26 (2): 169-177.
- Fraterova, L., Salaj, T., Matusikova, I. & Salaj, J. 2013. The role of chitinases and glucanases in somatic embryogenesis of black pine and hybrid firs. *Central European Journal of Biology* 8 (12): 1172-1182.
- Fry, S. 2000. Wall polymers: extraction and fractionation. *Teoksessa: The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*. New Jersey. USA: The Blackburn Press. s. 49-101.
- Fry, S. 2011. Cell wall polysaccharide composition and covalent crosslinking. *Teoksessa: Ulvskov, P. (toim.). Annual Plant Reviews 41: Plant polysaccharides, biosynthesis and bioengineering*. Blackwell Publishing Ltd. 1-42.
- Fry, S., Nesselrode, B., Miller, J. & Mewburn, B. 2008. Mixed-linkage (1→3,1→4)-β-D-glucan is a major hemicellulose of *Equisetum* (horsetail) cell walls. *New Phytologist* 179 (1): 104-115.
- Galatis, B. & Apostolakis, P. 2010. A new callose function involvement in differentiation and function of fern stomatal complexes. *Plant Signaling and Behavior* 5 (11): 1359-1364.
- Gardner, K. & Blackwell, J. 1975. Refinement of the structure of β-chitin. *Biopolymers* 14 (8): 1581-1595.
- Giummarella, N., Zhang, L., Henriksson, G. & Lawoko, M. 2016. Structural features of mildly fractionated lignin carbohydrate complexes (LCC) from spruce. *RSC Advances* 6 (48): 42120-42131.
- Gmeiner, C., Saadati, A., Maresch, D., Krasteva, s., Frank, M., Altman, F., Herwig, C. & Spadiut, O. 2015. Development of a fed-batch process for a recombinant *Pichia pastoris* Δoch1 strain expressing a plant peroxidase. *Microbial Cell Factories* 14 (1): 1-10.

- Gonzalez, L., El Kayal, W., Morris, J. & Cooke, J. 2015. Diverse chitinases are invoked during the activity-dormancy transition in spruce. *Tree Genetics and Genomes* 11: 41. DOI 10.1007/s11295-015-0871-0. Julkaistu 29.04.2015, viitattu 03.09.2016.
- Gooday, G., Zhu, W.-Y. & O'Donnell, R. 1992. What are the roles of chitinases in the growing fungus? *FEMS Microbiology Letters* 100 (1-3): 387–391.
- Goubet, F., Misrahi, A., Park, S.-K., Zhang, Z., Twell, D. & Dupree, P. 2003. AtCSLA7, a cellulose-synthase-like putative glycosyltransferase, is important for pollen tube growth and embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131 (2): 547–557
- Grower, A. 2012. Plant chitinases: Genetic diversity and physiological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31 (1): 57-73.
- Guo, X., Bai, L., Su, C., Shi, L. & Wang, D. 2013. Molecular cloning and expression of drought-induced protein 3 (DIP3) encoding a class III chitinase in upland rice. *Genetics and Molecular Research* 12 (4): 6860-6870.
- Hafren, J., Daniel, G. & Westermarck, U. 2000. The distribution of acidic and esterified pectin in cambium, developing xylem and mature xylem of *Pinus sylvestris*. *IAWA Journal* 21 (2): 157-168.
- Handford, M., Baldwin, T., Goubet, F., Prime, T., Miles, J., Yu, X. & Dupree, P. 2003. Localisation and characterisation of cell wall mannan polysaccharides in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218 (1): 27-36.
- Hengel, A. van 1998. Chitinases and arabinogalactan proteins in somatic embryogenesis. Väitöskirja. The Agricultural University of Wageningen, The Department of Molecular Biology. 120 s.
- Hengel, A. van, van Kammen, A. & de Vries, S. 2002. A relationship between seed development, arabinogalactan-proteins (AGPS) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum* 114 (4): 637-644.
- Hermans, C., Porco, S., Vandenbussche, F., Gille, S., de Pessemier, J., van der Straeten, D., Verbruggen, N. & Bush, D. 2011. Dissecting the role of *CHITINASE-LIKE1* in nitrate-dependent changes in root architecture. *Plant Physiology* 157 (3): 1313-1326.

- Hermans, C., Porco, S., Verbruggen, N. & Bush, D. 2010. Chitinase-like protein CTL1 plays a role in altering root system architecture in response to multiple environmental conditions. *Plant Physiology* 152 (2): 904-917.
- Hietala, A., Kvaalen, H., Schmidt, A., Jøhnk, N., Solheim, H. & Fossdal, C. 2004. Temporal and spatial profiles of chitinase expression by Norway spruce in response to bark colonization by *Heterobasidion annosum*. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (7): 3948-3953.
- Hoell, I., Dalhus, B., Heggset, E., Aspö, S. & Eijsink, V. 2006. Crystal structure and enzymatic properties of a bacterial family 19 chitinase reveal differences from plant enzymes. *FEBS Journal* 273 (21): 4889-4900.
- Hoell, I., Vaaje-Kolstad, G. & Eijsink, V. 2010. Structure and function of enzymes acting on chitin and chitosan. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 27: 331-366.
- Hossain, M., Noha, H.-N., Kima, K.-I., Koh, E.-J., Wib, S.-G., Baeb, H.-J., Lee, H. & Hong, S.-W. 2010. Mutation of the chitinase-like protein-encoding *AtCTL2* gene enhances lignin accumulation in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Plant Physiology* 167 (8): 650-657.
- Howe, G. & Jander, G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59: 41-66.
- Hsieh, Y. & Harris, P. 2012. Structures of xyloglucans in primary cell walls of gymnosperms, monilophytes (ferns *sensu lato*) and lycophytes. *Phytochemistry* 79: 87-101.
- Iseli, B., Armand, S., Boller, T., Neuhaus, J. & Henrissat, B. 1996. Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS Letters* 382 (1-2): 186-188.
- Islam, M., Strurrock, R. & Ekramoddoullah, A. 2011. Conifer chitinases. *The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology* 5 (1): 22-36.
- Islam, M., Strurrock, R., Williams, H. & Ekramoullah, A. 2010. Identification, characterization and expression analyses of class I and IV chitinase genes from Douglas-fir seedlings infected by *Phellinus sulphureus*. *Phytopathology* 100 (4): 356-366.

- Jang, M.-K., Kong, B.-G., Jeong, Y.-I., Lee, C. & Nah, J.-W. 2004. Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 42 (14): 3423-3432.
- Jarzabek, M., Pukacki, P. & Nucc, K. 2009. Cold-regulated proteins with potent anti-freeze and cryoprotective activities in spruces (*Picea* spp.). *Cryobiology* 58 (3): 268-274.
- Jia, X., Meng, Q., Zeng, H., Wang, W. & Yin, H. 2016. Chitosan oligosaccharide induces resistance to Tobacco mosaic virus in *Arabidopsis* via the salicylic acid-mediated signalling pathway. *Nature Scientific Reports* 6: 26144.
- Johnston, D. 2001. Functional genomics of plant chitinase-like genes. Maisterintutkielma. The University of Ottawa, The Faculty of Graduate Studies (Botany). 91 s.
- Kakoniova, D., Hlinkova, E., Liskova, D. & Kollarova, K. 2010. Oligosaccharides induce changes in protein patterns of regenerating spruce protoplasts. *General European Journal of Biology* 5 (3): 353-363.
- Kaku, H. & Shibuya, N. 2016. Molecular mechanisms of chitin recognition and immune signaling by LysM-receptors. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 95: 60-65.
- Kasprzewska, A. 2003. Plant chitinases – regulation and function. *Cellular and Molecular Biology Letters* 8 (3): 809-824.
- Kastrup, J. 2012. Can YKL-40 be a new inflammatory biomarker in cardiovascular disease? *Immunobiology* 217 (5): 483–491.
- Kesari, P., Patil, D., Kumar, P., Tomar, S., Sharma, A. & Kumar, P. 2015. Structural and functional evolution of chitinase-like proteins from plants. *Proteomics* 15 (10): 1693-1705.
- Kim, D., Kim, N. & Hwang, B. 2015. The *Capsicum annuum* class IV chitinase ChitIV interacts with receptor-like cytoplasmic protein kinase PIK1 to accelerate PIK1-triggered cell death and defence responses. *Journal of Experimental Botany* 66 (7): 1987-1999.
- Kim, Y., Lee, J., Yoon, G., Cho, H., Park, S.-W., Suh, M., Choi, D., Ha, H., Liu, J. & Pai, H.-S. 2000. CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase in tobacco. *Plant Physiology* 123 (3): 905-915.

- Koga, D. 2005. Application of chitinases in agriculture. *Journal of Metals, Materials and Minerals* 15 (1): 33-35.
- Kolosova, N., Breuil, C. & Bohlmann, J. 2014. Cloning and characterization of chitinases from interior spruce and lodgepole pine. *Phytochemistry* 101: 32-39.
- Koutaniemi, S., Toikka, M., Kärkönen, A., Mustonen, M., Lundell, T., Simola, L., Kilpeläinen, I. & Teeri, T. 2005. Characterization of basic *p*-coumaryl and coniferyl alcohol oxidizing peroxidases from a lignin-forming *Picea abies* suspension culture. *Plant Molecular Biology* 58 (2): 141-157.
- Koutaniemi, S., Warinowski, T., Kärkönen, A., Alatalo, E., Fossdal, C., Saranpää, P., Laakso, T., Fagerstedt, K., Simola, L., Paulin, L., Rudd, S. & Teeri, T. 2007. Expression profiling of the lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real-time RT-PCR. *Plant Molecular Biology* 65 (3): 311-328.
- Kragh, K., Hendriks, T., de Jong, A., Lo Schiavo, F., Bucherna, N., Hojrup, P., Mikkelsen, J. & de Vries, S. 1996. Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature-sensitive carrot variant *ts11*. *Plant Molecular Biology* 31 (3): 631-645.
- Kucerova, D., Kollarova, K., Vatehova, Z. & Liskova, D. 2016. Interaction of galactoglucomannan oligosaccharides with auxin involves changes in flavonoid accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry* 98: 155-161.
- Kuwabara, C. & Imai, R. 2009. Molecular basis of disease resistance acquired through cold acclimation in overwintering plants. *Journal of Plant Biology* 52 (1): 19-26.
- Kwon, Y., Kim, S.-H., Jung, M.-S., Kim, M.-S., Oh, J.-E., Ju, H.-W., Kim, K., Vierling, E., Lee, H. & Hong, S.-H. 2007. *Arabidopsis hot2* encodes an endochitinase-like protein that is essential for tolerance to heat, salt and drought stresses. *The Plant Journal* 49 (2): 184-193.
- Kwon, H.-K., Yokoyama, R. & Nishitani, K. 2005. A proteomic approach to apoplastic proteins involved in cell wall regeneration in protoplasts of *Arabidopsis* suspension-cultured cells. *Plant and Cell Physiology* 46 (6): 843-857.
- Kärkönen, A. & Fry, S. 2006. Effect of ascorbate and its oxidation products on H₂O₂ production in cell-suspension cultures of *Picea abies* and in the absence of cells. *Journal of Experimental Botany* 57 (8): 1633-1644.

- Kärkönen, A., Koutaniemi, S., Mustonen, M., Syrjänen, K., Brunow, G., Kilpeläinen, I., Teeri, T. & Simola, L. 2002. Lignification related enzymes in *Picea abies* suspension cultures. *Physiologia Plantarum* 114 (3): 343-353.
- Kärkönen, A., Meisrimler, C.-N., Takahashi, J., Väisänen E., Laitinen, T., Jimenez Barbosa, L., Holmström, S., Salonvaara, S., Wienkoop, S., Fagerstedt, K. & Luthje, S. 2014. Isolation of cellular membranes from lignin-producing tissues of Norway spruce and analysis of redox enzymes. *Physiologia Plantarum* 152 (4): 599-616.
- Kärkönen, A., Warinowski, T., Teeri, T., Simola, L. & Fry, S. 2009. On the mechanism of apoplastic H₂O₂ production during lignin formation and elicitation in cultured spruce cells - peroxidases after elicitation. *Planta* 230 (3): 553-567.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-685.
- Laine, R. & Lo, W. 1998. Diagnosis of fungal infections with a chitinase. Patentti. Julkaisunumero US6093552 A. United States Patent. Hakemuspäivämäärä 20.12.1996. Julkaisupäivämäärä 25.7.2000.
- Langner, T. & Göhre, V. 2016. Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. *Current Genetics* 62 (2): 243-254.
- Lawoko, M. 2005. Lignin polysaccharide networks in softwood and chemical pulps: characterisation, structure and reactivity. Väitöskirja. Royal Institute of Technology. Department of Fibre and Polymer Technology. Division of Wood Chemistry. Stockholm. 58 s.
- Lawoko, M. 2013. Unveiling the structure and ultrastructure of lignin carbohydrate complexes in softwoods. *International Journal of Biological Macromolecules* 62: 705-713.
- Lawrence, S. & Novak, N. 2006. Expression of poplar chitinase in tomato leads to inhibition of development in Colorado potato beetle. *Biotechnology Letters* 28 (8): 593-599.
- Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Laine, A.-C., Gomord, V. & Faye, L. 1998. N-glycoprotein biosynthesis in plants: Recent developments and future trends. *Plant Molecular Biology*. 38 (1-2): 31-48.

- Li, H., Miele, R., Mitchell, T. & Gerngross, T. 2007. N-linked glycan characterization of heterologous proteins. *Methods in Molecular Biology (Pichia Protocols)* 389: 139-149.
- Liang, T., Chen, Y., Yen, Y. & Wang, S. 2007. The antitumor activity of the hydrolysates of chitinous materials hydrolyzed by crude enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* V656. *Process Biochemistry* 42 (4): 527-534.
- Libantova, J., Kämäräinen, T., Moravcikova, J., Matusikova, I. & Salaj, J. 2009. Detection of chitinolytic enzymes with different substrate specificity in tissues of intact sundew (*Drosera rotundifolia* L.). *Molecular Biology Reports* 36 (5): 851-856.
- Liepman, A., Wilkerson, C. & Keegstra, K. 2005. Expression of cellulose synthase-like (*csI*) genes in insect cells reveals that *Cs/A* family members encode mannan synthases. *Proceedings of National Academy of Sciences* 102 (6): 2221-2226.
- Lippmann, R., Kaspar, S., Rutten, T., Melzer, M., Kumlehn, J., Matros, A. & Mock, H.-P. 2009. Protein and metabolite analysis reveals permanent induction of stress defense and cell regeneration processes in a tobacco cell suspension culture. *International Journal of Molecular Science* 10 (7): 3012-3032.
- Liskova, D., Auxtova, O., Kakoniova, D., Kubackova, M., Karacsonyi, S. & Bilisics, L. 1995. Biological activity of galactoglucomannan-derived oligosaccharides. *Planta* 196 (3): 425-429.
- Majorek, K., Kuhn, M., Chruszcz, M., Anderson, W. & Minor, W. 2014. Double trouble - Buffer selection and his-tag presence may be responsible for nonreproducibility of biomedical experiments. *Protein Science* 23 (10): 1359-1368.
- Martinez-Caballero, S., Cano-Sanchez, P., Mares-Mejia, I., Diaz-Sanchez, A., Macias-Rubalcava, M., Hermoso, J. & Rodriguez-Romero, A. 2014. Comparative study of two GH19 chitinase-like proteins from *Hevea brasiliensis*, one exhibiting a novel carbohydrate-binding domain. *FEBS Journal* 281 (19): 4535-4554.
- McCann, M. & Knox, P. 2012. *Plant Cell Wall Biology: Polysaccharides in Architectural and Developmental Contexts*. Teoksessa: The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. New Jersey. USA: The Blackburn Press. s. 343-366.

- Miller, M., Palojarvi, A., Rangger, A., Reeslev, M. & Kjoller, A. 1998. The use of fluorogenic substrates to measure fungal presence and activity in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (2): 613–617.
- Minke, R. & Blackwell, J. 1978. The structure of α -chitin. *Journal of Molecular Biology* 120 (2): 167-181.
- Mitsunaga, T., Iwase, M., Yuki, D. & Koga, D. 2004. Intracellular localization of a class IV chitinase from yam. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68 (7): 1518-1524.
- Mokshina, N., Gorshkova, T. & Deyholos, M. 2014. Chitinase-like (CTL) and cellulose synthase (CESA) gene expression in gelatinous-type cellulosic walls of flax (*Linum usitatissimum* L.) bast fibers. *PLOS ONE* 9 -verkkodokumentti. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0097949>. Julkaistu 11.07.2014, viitattu 31.10.2014.
- Moller, I., Sørensen, I., Bernal, A., Blaukopf, C., Lee, K., Øbro, J., Pettolino, F., Roberts, A., Mikkelsen, J., Knox, J., Bacic, A. & Willats, W. 2007. High-throughput mapping of cell-wall polymers within and between plants using novel microarrays. *The Plant Journal* 50 (6): 1118-1128.
- Montesino, R., García, R., Quintero, O. & Cremata, J. 1998. Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 14 (2): 197-207.
- Mulimani, V. & Prashanth, S. 2002. Investigating plant galactomannans. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 30 (2): 101-103.
- Nagpure, A., Choudhary, B. & Gupta, R. 2014. Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Critical Reviews in Biotechnology* 34 (3): 215-232.
- Nagy, N., Fossdal, C., Dalen, L., Lönneborg, A., Hørdal, I. & Johnsen, Ø. Effects of Rhizoctonia infection and drought on peroxidase and chitinase activity in Norway spruce (*Picea abies*). 2004. *Physiologia Plantarum* 120 (3): 465-473.
- Neuhaus, J.-M., Sticher, L., Meins, F. & Boller, T. 1991. A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 88 (22): 10362-10366.

- Neuhaus, J.-M., Fritig, B., Linthorst, H., Meins, F., Mikkelsen, J., & Ryals, J. 1996. A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Molecular Biology reporter* 14 (2): 102-104.
- Nystedt, B., Street, N., Wetterbom, A., Zuccolo, A., Lin, Y.-C., Scofield, D., Vezzi, F., Delhomme, N., Giacomello, S., Alexeyenko, A., Vicedomini, R., Sahlin, K., Sherwood, E., Elfstrand, M., Gramzow, L., Holmberg, K., Hällman J., Keech, O., Klasson, L., Koriabine, M., Kucukoglu, M., Kaller, M., Luthman, J., Lysholm, F., Niittyla, T., Olson, Å., Rilakovic, N., Ritland, C., Rossello, J., Sena, J., Svensson, T., Talavera-Lopez, C., Theißen, G., Tuominen, H., Vanneste, K., Wu, Z.-Q., Zhang, B., Zerbe, P., Arvestad, L., Bhalerao, R., Bohlmann, J., Bousquet, J., Garcia Gil, R., Hvidsten, T., de Jong, P., MacKay, J., Morgante, Ritland, K., Sundberg, B., Thompson, S., Van de Peer, Y., Andersson, B., Nilsson, O. Ingvarsson, P., Lundeberg, J. & Jansson, S. 2013. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature* 497 (7451): 579-584.
- Ohnuma, T., Numata, T., Osawa, T., Mizuhara, M., Lampela, O., Juffer, A., Skriver, K. & Fukamizo, T. 2011. A class V chitinase from *Arabidopsis thaliana*: Gene responses, enzymatic properties, and crystallographic analysis. *Planta* 234 (1): 123-137.
- Oinonen, P., Zhang, L., Lawoko, M. & Henriksson, G. 2015. On the formation of lignin polysaccharide networks in Norway spruce. *Phytochemistry* 111: 177-184.
- Oliveira-Garcia, E. & Valent, B. 2015. How eukaryotic filamentous pathogens evade plant recognition. *Current Opinion in Microbiology* 26: 92-101.
- Ovtsyna, A., Schultze, M., Tichonovich, I., Spaink, H., Kondorosi, E., Kondorosi, A. & Staehelin, C. 2000. Nod factors of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and their fucosylated derivatives stimulate a nod factor cleaving activity in pea roots and are hydrolyzed in vitro by plant chitinases at different rates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13 (8): 799-807.
- Park, H.-Y., Pan, C.-H., So, M.-Y., Ahn, J.-H., Jo, D.-H. & Kim, S.-I. 2002. Purification, characterization, and cDNA cloning of rice class III chitinase. *Molecules and Cells* 13 (1): 69-76.
- Peberdy, J. 1989. Fungi without coats-protoplasts as tools for mycological research. *Mycological Research* 93: 1-20.

- Passarinho, P., van Hengel, A., Fransz, P. & de Vries, S. 2001. Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana* *AtEP3/AtchitIV* endochitinase gene. *Planta* 212 (4): 556-567.
- Patil, R., Ghormade, V. & Deshpande, M. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology* 26 (7): 473-483.
- Petutschnig, E., Jones, A., Serazetdinova, L., Lipka, U. & Lipka, V. 2012. The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (37): 28902-28911.
- PlantProbes. 2016. Monoclonal antibodies to plant cell wall components. <http://www.plantprobes.net/PPcat1511.pdf>. Julkaistu 11/2015, viitattu 31.08.2016.
- Popper, Z. Evolution and diversity of green plant cell walls. 2008. *Current Opinion in Plant Biology* 11 (3): 286-292.
- Popper, Z. & Fry, S. 2004. Primary cell wall composition of pteridophytes and spermatophytes. *New Phytologist* 164 (1): 165-174.
- Porkka, K., Schückel, J., Teeri, T., Willats W. & Kärkönen, A. 2013. Chitinases in a lignin-producing cell culture of Norway spruce. Poster. 25th Congress of the Scandinavian Plant Physiology Society. Helsingör, Tanska.
- Rathore, A. & Gupta, R. 2015. Chitinases from bacteria to human: Properties, applications and future perspectives. *Enzyme Research*. Verkkodokumentti. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/791907>. Julkaistu 19.11.2015. Viitattu 10.09.2016.
- Rogers, L., Dubos, C., Surman, C., Willment, J., Cullis, I., Mansfield, S. & Campbell, M. 2005. Comparison of lignin deposition in three ectopic lignification mutants. *New Phytologist* 168 (1): 123-140.
- Sabaty, M., Grosse, S., Adryanczyk, G., Boiry, S., Biaso, F., Arnoux, P. & Pignol, D. 2013. Detrimental effect of the 6 His C-terminal tag on YedY enzymatic activity and influence of the TAT signal sequence on YedY synthesis. *BMC Biochemistry* 14 (1): 1-28.
- Salzer, P., Bonanomi, A., Beyer, K., Vögeli-Lange, R., Aeschbacher, R., Lange, J., Wiemken, A., Kim, D., Cook, D. & Boller, T. 2000. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza

- formation, nodulation and pathogen infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13 (7): 763-78.
- Salzer, P., Hebe, G. & Hager, A. 1997. Cleavage of chitinous elicitors from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme* by host chitinases prevents induction of K⁺ and Cl⁻ release, extracellular alkalinization and H₂O₂ synthesis of *Picea abies* cell. *Planta* 203 (4): 470-479.
- Sanchez-Rodriguez, C., Bauer, S., Hematy, K., Saxe, F., Belen Ibanez, A., Vodermaier, V., Konlechner, C., Sampathkumar, A., Rüggeberg, M., Aichinger, E., Neumetzler, R., Burgert, I., Somerville, C., Hauser, M.-T. & Persson, S. 2012. CHITINASE-LIKE1/POM-POM1 and its homolog CTL2 are glucan-interacting proteins important for cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24 (2): 589-607.
- Santos, A. dos, Wiethölter, N., El Gueddari, N. & Moerschbacher, B. 2006. Protein expression during seed development in *Araucaria angustifolia*: Transient accumulation of class IV chitinases and arabinogalactan proteins. *Physiologia Plantarum* 127 (1): 138-148.
- Santos, P., Fortunato, A., Ribeiro, A. & Pawlowski, K. 2008. Chitinases in root nodules. *Plant Biotechnology* 25 (3): 299-307.
- Sarkar, P., Bosneaga, E. & Auer, M. 2009. Plant cell walls throughout evolution: to-wards a molecular understanding of their design principles. *Journal of Experimental Botany* 60 (13): 3615-3635.
- Sauter, M. & Hager, A. 1989. The mycorrhizal fungus *Amanita muscaria* induces chitinase activity in roots and in suspension-cultured cells of its host *Picea abies*. *Planta* 179 (1): 61-66.
- Schultze, M., Staehelin, C., Brunner, F., Genetet, I., Legrand, M., Fritig, B., Kondorosi, E. & Kondorosi, A. 1998. Plant chitinase/lysozyme isoforms show distinct substrate specificity and cleavage site preference towards lipochitooligosaccharide Nod signals. *The Plant Journal* 16 (5): 571-580.
- Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H. & Shibuya, N. 2010. Two *LysM* receptor molecules, *CEBiP* and *OsCERK1*, co-operatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *The Plant Journal* 64 (2): 204-214.

- Shinshi, H., Mohnen, D. & Meins, F. 1987. Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: Inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (1): 89-93.
- Simola, L., Lemmetyinen, J. & Santanen, A. 1992. Lignin release and photomixotrophism in suspension cultures of *Picea abies*. *Physiologia Plantarum* 84 (3): 374-379.
- Sims, I., Craik, D. & Bacic, A. 1997. Structural characterisation of galactoglucomannan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Carbohydrate Research* 303 (1): 79-92.
- Sørensen, I. & Willats, W. 2008. Plant cell walls: New insights from ancient species. *Plant Signaling and Behavior* 3 (9): 743-745.
- Sørli, M., Zakariassen, H., Norberg, A. & Eijsink, V. 2012. Processivity and substrate-binding in family 18 chitinases. *Biocatalysis and Biotransformation* 30 (3): 353-365.
- Stoykov, Y., Pavlov, A. & Krastanov, A. Chitinase biotechnology: Production, purification and application. 2015. *Engineering in Life Sciences* 15 (1): 30-38.
- Strasser, R. 2016. Plant protein glycosylation. *Glycobiology* 26 (9): 926-939.
- Su, Y., Xu, L., Fu, Z., Yang, Y., Guo, J., Wang, S., & Que, Y. 2014. *ScChi*, encoding an acidic class III chitinase of sugarcane, confers positive responses to biotic and abiotic stresses in sugarcane. *International Journal of Molecular Sciences* 15 (2): 2738-2760.
- Suarez, V., Staehelin, C., Arango, R., Holtorf, H., Hofsteenge, J. & Meins, F. 2001. Substrate specificity and antifungal activity of recombinant tobacco class I chitinases. *Plant Molecular Biology* 45 (5): 609-618.
- Taira, T., Fujiwara, M., Denhart, N., Hayashi, H., Onaga, S., Ohnuma, T., Letzel, T., Sakuda, S. & Fukamizo, T. 2010. Transglycosylation reaction catalyzed by a class V chitinase from cycad, *Cycas revoluta*: A study involving site-directed mutagenesis, HPLC, and real-time ESI-MS. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1804 (4): 668-675.
- Taira, T., Hayashi, H., Tajiri, Y., Onaga, S., Uechi, G., Iwasaki, H., Ohnuma, T. & Fukamizo, T. 2009. A plant class V chitinase from a cycad (*Cycas revoluta*): Biochemical characterization, cDNA isolation, and posttranslational modification. *Glycobiology* 19 (12): 1452-1461.

- Takenaka, Y., Nakano, S., Tamoi, M., Sakuda, S. & Fukamizo, T. 2009. Chitinase gene expression in response to environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*: chitinase Inhibitor allosamidin enhances stress tolerance. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73 (5): 1066-1071.
- Teleman, A. 2009. Hemicelluloses and pectins. Teoksessa: Ek, M., Gellerstedt, G. & Henriksson, G. (toimittajat). *Pulp and Paper Chemistry and Technology: Wood Chemistry and Biotechnology*. Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co. s. 102-120.
- Trudel, J. & Asselin, A. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 178 (2): 362-366.
- Ubhayasekera, W. 2010. Structure and function of chitinases from glycoside hydrolase family 19. *Polymer International* 60 (6): 890-896.
- Ubhayasekera, W., Rawat, R., Ho, S., Wiveger, M., von Arnold, S., Chye, M.-L. & Mowbray, S. 2009. The first crystal structures of a family 19 class IV chitinase: the enzyme from Norway spruce. *Plant Molecular Biology* 71 (3): 277-289.
- Umemoto, N., Kanda, Y., Ohnuma, T., Osawa, T., Numata, T., Sakuda, S., Taira, T. & Fukamizo, T. 2015. Crystal structures and inhibitor binding properties of plant class V chitinases: The cycad enzyme exhibits unique structural and functional features. *Plant Journal* 82 (1): 54-66.
- Umemoto, N., Ohnuma, T., Mizuhara, M., Sato, H., Skriver, K. & Fukamizo, T. 2013. Introduction of a tryptophan side chain into subsite +1 enhances transglycosylation activity of a GH-18 chitinase from *Arabidopsis thaliana*, *AtChiC*. *Glycobiology* 23 (1): 81-90.
- Umemoto, N., Ohnuma, T., Osawa, T., Numata, T. & Fukamizo, T. 2015. Modulation of the transglycosylation activity of plant family GH18 chitinase by removing or introducing a tryptophan side chain. *FEBS Letters* 589 (18): 2327-2333.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S., Sørli, M. & Eijsink, V. 2013. The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* - A model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS Journal* 280 (13): 3028-3049.
- Vasconcelos, E., Santana, C., Godoy, C., Seixas, C., Silva, M., Moreira, L., Oliveira-Neto, O., Price, D., Fitches, E., Filho, E., Mehta, A., Gatehouse, J. & Grossi-De-Sa, M. 2011. A new chitinase-like xylanase inhibitor protein (XIP) from coffee (*Coffea arabica*) affects Soybean Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) spore

- germination. BMC Biotechnology 11: 14. <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/11/14>. Julkaistu 04.02.2011, viitattu 04.09.2016.
- Velmala, S., Rajala, T., Heinonsalo, J., Taylor, A. & Pennanen, T. 2014. Profiling functions of ectomycorrhizal diversity and root structuring in seedlings of Norway spruce (*Picea abies*) with fast- and slow-growing phenotypes. New Phytologist 201 (2): 610-622.
- Veluthakkal, R., Sundari, B. & Dasgupta, M. 2012. Tree chitinases - stress- and developmental-driven gene regulation. Forest Pathology 42 (4): 271-278.
- Wendt dos Santos, A., Steiner, N., Guerra, M., Zoglauer, K. & Moerschbacher, B. 2008. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*. Biologia Plantarum 52 (1): 195-199.
- Vidal-Melgosa, S., Pedersen, H., Schückel, J., Arnal, G., Dumon, C., Amby, D., Nygaard Monrad, R., Westereng, B. & Willats, W. 2015. A new versatile microarray-based method for high throughput screening of carbohydrate-active enzymes. The Journal of Biological Chemistry 290 (14): 9020-9036.
- Wan, J., Zhang, X., Neece, D., Ramonell, K., Clough, S., Kim, D., Stacey, M. & Stacey, G. 2008. A *LysM* receptor-like kinase plays a critical role in chitin signalling and fungal resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell 20 (2): 471-481.
- Wan, J., Zhang, X. & Stacey, G. 2004. Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in *Arabidopsis* by chitin. Molecular Plant Pathology 5 (2): 125-135.
- Watanabe, T., Kanai, R., Kawase, T., Tanabe, T., Mitsutomi, M., Sakuda, S. & Miyashita, K. 1999. Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: Characterization and distribution. Microbiology 145 (12): 3353-3363.
- Wiveger, M., Farbos, I., Ingouff, M., Lagercranz, U. & von Arnold, S. 2003. Expression of *Chia4-Pa* chitinase genes during somatic and zygotic embryo development in Norway spruce (*Picea abies*): similarities and differences between gymnosperm and angiosperm class IV chitinases. Journal of Experimental Botany 54 (393): 2691-2699.
- Wu, B., Zhang, B., Dai, Y., Zhang, L., Shang-Guan, K., Peng, Y., Zhou, Y. & Zhu, Z. 2012. *Brittle Culm15* encodes a membrane-associated chitinase-like protein required for cellulose biosynthesis in rice. 2012. Plant Physiology 159 (4): 1440-1452.

- Wu, J., Wang, Y., Kim, S., Kim, S. & Kang, K. 2013. Characterization of a newly identified rice chitinase-like protein (OsCLP) homologous to xylanase inhibitor. *BMC Biotechnology* 13: 4. <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/13/4>. Julkaistu 18.01.2013, viitattu 04.09.2016.
- Yaqoob, N., Yakovleva, I., Krokene, P., Kvaalen, H., Solheim, H. & Fossdal, V. 2012. Defence-related gene expression in bark and sapwood of Norway spruce in response to *Heterobasidion parviporum* and methyl jasmonate. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 77 (1): 10-16.
- Yeon, Y., Park, H., Park, H.-Y. & Yoo, Y. 2014. Effect of His-tag location on the catalytic activity of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 19 (5): 798-802.
- Zhang, D., Hrmova, M., Wan, C., Wu, C., Balzen, J., Cai, W., Wang, J., Densmore, L., Fincher, G., Zhang, H. & Haigler, C. 2004. Members of a new group of chitinase-like genes are expressed preferentially in cotton cells with secondary walls. *Plant Molecular Biology* 54 (3): 353-372.
- Zhong, R., Kays, S., Schroeder, B. & Ye, Z. 2002. Mutation of a chitinase-like gene causes ectopic deposition of lignin, aberrant cell shapes and overproduction of ethylene. *Plant Cell* 14 (1): 165-179.